

**Bildung und Charakterisierung biologisch und
physiko-chemisch aktiver Metabolite aus den
marinen schwamm-assoziierten Bakterien
Psychroflexus spec. nov. und *Bacillus subtilis***

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von
Werner Ramm
aus Dungenbeek

| | |
|----------------------------------|------------------------|
| 1. Referent: | PD Dr. S. Lang |
| 2. Referent: | Prof. Dr. K. D. Vorlop |
| Eingereicht am: | 06. August 2001 |
| Mündl. Prüfung (Disputation) am: | 22. Oktober 2001 |

Vorabveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, PD Dr. S. Lang, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Ramm, W., Wicke, C., Lang, S. (2000): Growth and Bioactive Metabolite Production of Marine Bacteria. Proceedings of the 4th International Congress on Biochemical Engineering, Stuttgart, pp 94 – 98.

Ramm, W., Wicke, C., Lang, S. (2000): Growth and Bioactive Glycoglycerolipid Production of Marine Bacteria. Biotechnology 2000: Abstract Book of The World Congress on Biotechnology, 11th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Vol 2, Berlin, p. 334.

Tagungsbeiträge

Ramm, W., Wicke, C., Lang, S. (2000): Growth and Bioactive Metabolite Production of Marine Bacteria. 4th International Congress on Biochemical Engineering 2000, Stuttgart, 16. – 18.02.2000 (Poster).

Ramm, W., Wicke, C., Lang, S. (2000): Growth and Bioactive Glycoglycerolipid Production of Marine Bacteria. Biotechnology 2000: The World Congress on Biotechnology, Berlin, 03. – 08.09.2000 (Poster).

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Technischen Universität Braunschweig unter der Leitung von Herrn PD Dr. S. Lang angefertigt.

Herrn PD Dr. Siegmund Lang danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die ständige und anregende Diskussionsbereitschaft und für seine engagierte Arbeitsgruppenleitung.

Herrn Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Dem Land Niedersachsen danke ich für die finanzielle Förderung dieser Arbeit.

Herrn Dr. V. Wray und Herrn Dr. M. Nimtz (GBF) danke ich herzlich für ihre umfangreiche Unterstützung bei der Strukturaufklärung und Herrn W. Schatton (KliniPharm, Frankfurt) für die Überlassung des Schwammes *Acanthella acuta*. Für die Bemühungen zur Bestimmung der Mikroorganismen danke ich Frau Dr. Wagner-Göbler (GBF) und Frau Steffen (DSMZ).

Ein großes Dankeschön geht an die ehemaligen und jetzigen Mitglieder der Abteilung Biotechnologie für die nette und angenehme Arbeitsatmosphäre. Frau Margret Hesse und Herrn Detlef Rasch danke ich für ihre stets freundliche und ruhige Hilfsbereitschaft. Ein spezieller Dank geht an Ute-Christina Mertens: Ohne Dich wäre vieles nicht möglich gewesen.

Alles fließt. Nichts besteht.

INHALTSVERZEICHNIS

| | | |
|-----------|---------------------------------------------------------|-----------|
| I | Einleitung und Zielsetzung | 1 |
| II | Material und Methoden | 9 |
| 1. | Mikroorganismen | 9 |
| 1.1 | Isolierung der Mikroorganismen..... | 9 |
| 1.2 | Gram-Verhalten..... | 10 |
| 1.3 | Oxidasetest | 10 |
| 1.4 | BBL® Oxi/Ferm™ Tube II..... | 10 |
| 1.5 | BBL® Enterotube II | 11 |
| 1.6 | BBL® Crystal™ | 11 |
| 2. | Chemikalien | 12 |
| 2.1 | Chemikalien für Nährmedien | 12 |
| 3. | Nährmedien | 13 |
| 4. | Kulturführung | 14 |
| 4.1 | Stammkulturen | 14 |
| 4.2 | Glycerinkonserven..... | 14 |
| 4.3 | Stickstoffkonserven | 14 |
| 5. | Kultivierungen im Schüttelkolben..... | 15 |
| 5.1 | Vorkultur..... | 15 |
| 5.2 | Hauptkultur | 15 |
| 6. | Kultivierungen im Bioreaktor | 16 |
| 6.1 | 50 l Bioreaktor | 16 |
| 7. | Kultivierungsparameter | 17 |
| 7.1 | Zelldichte | 17 |
| 7.2 | Biotrockenmasse | 17 |
| 7.3 | Abgasanalyse..... | 17 |
| 7.4 | Wachstumsrate, Ertrags- und Ausbeutekoeffizienten | 19 |
| 8. | Analytik | 20 |
| 8.1 | Glucosekonzentration..... | 20 |
| 8.2 | Proteinkonzentration..... | 20 |
| 8.3 | Ammoniumkonzentration..... | 21 |
| 8.4 | Stickstoffkonzentration | 22 |

| | | |
|------------|------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 8.5 | Phosphatkonzentration..... | 22 |
| 9. | Aufreinigung und Charakterisierung von Metaboliten | 23 |
| 9.1 | Kulturaufarbeitung | 23 |
| 9.2 | Charakterisierung des Produktspektrums | 23 |
| 9.3 | Quantitative Bestimmung..... | 24 |
| 9.4 | Präparative Säulenchromatographie | 25 |
| 9.5 | Präparative Schichtchromatographie..... | 25 |
| 9.6 | Präparative MPLC | 26 |
| 9.7 | Kernspinresonanzspektroskopie..... | 26 |
| 9.8 | Massenspektrometrie | 27 |
| 9.9 | Oberflächen- und Grenzflächenspannung | 27 |
| 9.10 | Spreitungsverhalten..... | 28 |
| 9.11 | Emulsionstest..... | 28 |
| 10. | Chemische und biochemische Methoden | 30 |
| 10.1 | Alkalische Verseifung des Glycoglycerolipids | 30 |
| 10.2 | Enzymatische Hydrolyse des Glycoglycerolipids | 31 |
| 10.3 | Enzymatische Acylierung des Glycoglycerins..... | 31 |
| 11. | Untersuchung von biologischen Aktivitäten..... | 32 |
| 11.1 | Antimikrobielle Aktivitätstests | 32 |
| 11.2 | Agardiffusionstest..... | 33 |
| 11.3 | DC-Overlaytest..... | 33 |
| 11.4 | Bouillon-Dilutionstest..... | 33 |
| 11.5 | Externe Aktivitätstests | 34 |
| III | Ergebnisse..... | 35 |
| 1. | Screening nach Bakterien aus <i>Acanthella acuta</i> | 35 |
| 1.1 | Isolierung und Anreicherung der Mikroorganismen..... | 35 |
| 2. | Biologisches und chemisches Screening | 37 |
| 2.1 | Agardiffusionstest..... | 37 |
| 2.2 | Chemisches Screening..... | 39 |
| 3. | Das Bakterienisolat AAS12..... | 41 |
| 3.1 | Das Wachstumsverhalten von <i>Psychroflexus spec.</i> | 42 |
| 3.2 | Mediumsoptimierung von <i>Psychroflexus spec.</i> | 43 |
| 3.3 | Einfluss der Inkubationstemperatur | 45 |
| 3.4 | Bioreaktorkultivierung von <i>Psychroflexus spec.</i> | 46 |
| 3.5 | Charakterisierung des Farbstoffes aus <i>Psychroflexus spec.</i> | 47 |

| | |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 4. Das Bakterienisolat AAS3..... | 49 |
| 4.1 Das Wachstumsverhalten des marinen <i>Bacillus subtilis</i> auf Marine Broth | 49 |
| 4.2 Optimierung des Wachstums durch zusätzliche C-Substrate..... | 50 |
| 4.3 Bioreaktorkultivierung des marinen <i>Bacillus subtilis</i> | 51 |
| 4.4 Isolierung und Charakterisierung des Glycoglycerolipids aus <i>Bacillus subtilis</i> ... | 54 |
| 5. Das Wachstumsverhalten des marinen <i>Bacillus subtilis</i> auf dem Synthetischen Meerwassermedium SM1 | 56 |
| 5.1 Zusätzliche komplexe Bestandteile..... | 57 |
| 5.2 Einsatz verschiedener Glucosekonzentrationen | 58 |
| 5.3 Einfluss der Inkubationstemperatur | 59 |
| 5.4 Einfluss der Mineralsalzkonzentration..... | 60 |
| 5.5 Einfluss der Stickstoffquelle | 61 |
| 5.6 Einfluss der Phosphatquelle | 63 |
| 6. Bioreaktorkultivierung des marinen <i>Bacillus subtilis</i> auf SM1 | 64 |
| 7. Modifikation des Glycoglycerolipids GGL11 aus dem marinen <i>Bacillus subtilis</i> | 68 |
| 7.1 Darstellung des Glycoglycerins GG11 durch alkalische Verseifung | 68 |
| 7.2 Darstellung des GG11 durch enzymatische Hydrolyse | 69 |
| 7.3 Enzymatische Acylierung des Glycoglycerins GG11..... | 73 |
| 7.4 Darstellung eines neuen Glycoglycerolipids durch enzymatische Acylierung des GG11..... | 77 |
| 8. Physiko-chemische Eigenschaften der Glycoglycerolipide GGL11 und GGL12 | 82 |
| 8.1 Oberflächen- und Grenzflächenspannung | 82 |
| 8.2 Spreitung | 84 |
| 8.3 Emulsionstests | 85 |
| 9. Biologische Aktivität..... | 89 |
| 9.1 Antimikrobielle Eigenschaften..... | 89 |
| 9.2 Pharmakologische Assays..... | 90 |
| IV Diskussion | 94 |
| 1. Screening..... | 95 |
| 2. <i>Psychroflexus spec. (AAS12)</i> aus dem Schwamm <i>Acanthella acuta</i> | 99 |
| 2.1 Charakterisierung des Bakteriums | 99 |
| 2.2 Wachstumsoptimierung von <i>Psychroflexus spec.</i> | 100 |

| | | |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2.3 | Charakterisierung des Farbstoffes aus <i>Psychroflexus</i> spec..... | 103 |
| 3. | <i>Bacillus subtilis</i> (AAS3) aus dem Schwamm <i>Acanthella acuta</i> | 104 |
| 3.1 | Charakterisierung des Bakteriums..... | 104 |
| 3.2 | Wachstums- und Produktoptimierung des marinen <i>Bacillus subtilis</i> | 107 |
| 3.3 | Charakterisierung des Glycoglycerolipids aus <i>Bacillus subtilis</i> | 112 |
| 4. | Modifikation des Glycoglycerolipids GGL11 aus <i>Bacillus subtilis</i> | 113 |
| 4.1 | Enzymatische Hydrolyse des Glycoglycerolipids GGL11 | 115 |
| 4.2 | Enzymatische Acylierung des Glycoglycerins GG11..... | 116 |
| 5. | Charakterisierung der physiko-chemischen Eigenschaften | 119 |
| 6. | Biologische Aktivität..... | 123 |
| V | Zusammenfassung | 127 |
| VI | Literatur..... | 130 |
| VII | Anhang..... | 145 |
| 1. | Tabellen zur Kernspinresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie | 145 |
| 2. | Abkürzungsverzeichnis | 152 |

I Einleitung und Zielsetzung

Naturstoffe stellen in der Wirkstoffforschung einen der Ausgangspunkte bei der Suche nach neuen Leitstrukturen dar, die zu neuen Arzneimitteln und Pflanzenschutzmitteln führen können. Zum überwiegenden Teil werden Naturstoffe aus terrestrischen Quellen, wie Pflanzen, Pilzen und Mikroorganismen isoliert und auf ihre biologische Wirkung hin untersucht. Zur Zeit sind über 50 % der wichtigsten und umsatzstärksten Medikamente Naturstoffe oder lassen sich auf Naturstoffderivate zurückführen [Kerr et al., 1999].

Drei der bekanntesten Beispiele sind die Medikamente Aspirin, Morphinum und Penicillin. Der Aspirinwirkstoff Acetylsalicylsäure wurde aus der Weidenrinde isoliert, nachdem die Rinde des Baumes als probates Mittel gegen Zahnschmerzen Anwendung fand. Der weitverbreitete Schmerzkiller Morphinum wurde zuerst aus der Mohnpflanze isoliert und das die Entwicklung der Antibiotika auslösende Penicillin im Brotschimmel (Schimmelpilz) entdeckt. Schon seit Jahrtausenden nutzt die Menschheit zahllose Pflanzenextrakte für medizinische Anwendungen. Durch Versuch und Irrtum entdeckte man schon früh, dass bestimmte Pflanzen verschiedene therapeutische Effekte aufweisen. In der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts haben die Wissenschaftler gelernt, die aktiven Substanzen der wirksamen Extrakte aufzureinigen und diese Wirkstoffe nach chemischer Synthese als Medikamente einzusetzen.

Ein Vorteil der Naturstoffe gegenüber chemisch-synthetischen Verbindungen liegt in der Vielfalt komplexer Strukturen, die umfangreiche biologische Informationen beinhalten und synthetisch nur schwer oder gar nicht zugänglich sind. Darüber hinaus haben sich die Naturstoffe im Rahmen der Evolution weiterentwickelt, um biologische Vorgänge und Veränderungen beeinflussen zu können. Schließlich sind Naturstoffe nachwachsende Rohstoffe und somit ist ihre Herstellung meistens umweltfreundlich [Bindseil, 1996].

Das Potenzial an biogenen Wirkstoffen ist jedoch keinesfalls erschöpft, wie sich durch die große Zahl von Neuentdeckungen belegen lässt, die fortlaufend publiziert werden. Das Hauptaugenmerk der Naturstoffforschung liegt dabei zur Zeit in der

Nutzung mariner Ressourcen als Quelle für neue Wirkstoffe. Marine Quellen als Ausgangspunkt für die Suche nach neuen Naturstoffen heranzuziehen, erscheint deshalb aussichtsreich, weil die Ozeane, die mehr als 70 % der Erdoberfläche bedecken, viele unterschiedliche Habitate für marine Organismen aufweisen [Jensen und Fenical, 1996]. Aufgrund der extremen Variabilität in Druck, Temperatur, Salinität und Nährstoffangebot in den Ozeanen zeigen marine Organismen einzigartige metabolische und physiologische Fähigkeiten [De Vries und Hall, 1994].

Von den heute etwa 150000 bekannten Naturstoffen sind weniger als 5 % marinen Ursprungs. Dies ist überwiegend darauf zurückzuführen, dass dieser Lebensraum schwer zugänglich ist und dort häufig besondere Lebensbedingungen herrschen, die nicht einfach nachzuahmen sind. Trotzdem steigt die Anzahl der neu beschriebenen marinen Naturstoffe stetig an [Faulkner, 2000; Faulkner, 2000a].

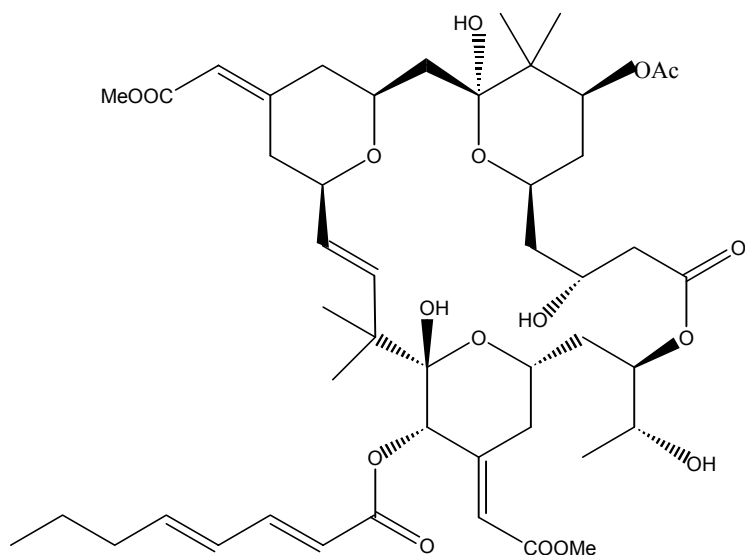
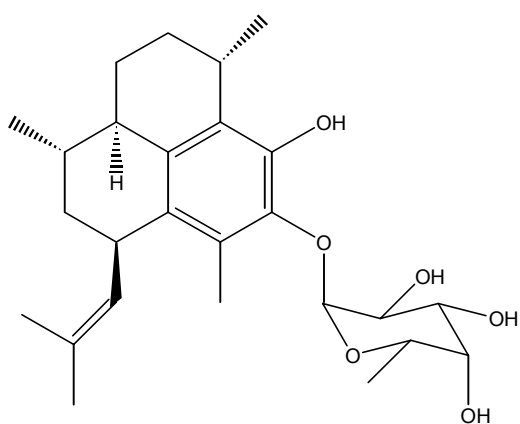
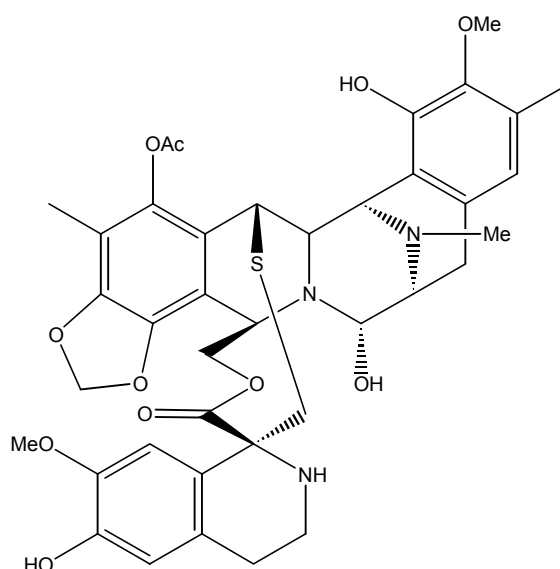
Zwar sind bis heute alle Medikamente, die aus Naturstoffen abgeleitet sind, terrestrischen Ursprungs. Dennoch zeigen die bisherigen Forschungen, Medikamente aus marinen Organismen zu gewinnen, dass die Medikamente der Zukunft aus den Ozeanen kommen könnten. Um das biomedizinische Potenzial eines Organismus abschätzen zu können, muss sowohl die chemische Ökologie des Organismus als auch seine Evolutionsgeschichte berücksichtigt werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass primitive Mikroorganismen chemische Verteidigungsmechanismen entwickelten, die aber in höher entwickelten Organismen durch physikalische Verteidigungsmethoden und/oder die Fähigkeit zu fliehen oder sich zu verstecken, ersetzt wurden. Sessile marine Invertebraten sind deshalb die Kandidaten der Wahl für die Produktion von bioaktiven Metaboliten. Jeder zufällig neu gebildete Sekundärmetabolit, der einen evolutionären Vorteil für den produzierenden Organismus bietet, wird zum Fortbestand beitragen. Sessile marine Invertebraten haben eine lange Evolutionsgeschichte und hatten daher zahlreiche Möglichkeiten, ihr chemisches Verteidigungsarsenal zu verbessern. Zwar können chemische Verteidigungsmechanismen nicht direkt mit der biomedizinischen Aktivität gleichgesetzt werden, aber es ist bemerkenswert wie gut sie in der Realität miteinander korrelieren. Zu den besten marinen Quellen pharmakologisch wirksamer Verbindungen zählen Bakterien (incl. Cyanobakterien), Pilze, Algen, Schwämme, Korallen, Moos- und Manteltiere [Faulkner, 2000b].

Die marinen Naturstoffe Bryostatin 1, Ecteinascidin 743 und Pseudopterosin E befinden sich in der klinischen Testung und gelten als vielversprechende Wirkstoffe, die den kommerziellen Durchbruch als Medikamente schaffen könnten. Die jeweiligen Strukturen sind in der Abbildung I.1 dargestellt.

Bryostatin 1 ist ein makrocyclischer Naturstoff, der zuerst aus dem Moostierchen *Bugula neritina* isoliert wurde [Pettit et al., 1982]. Bryostatin besitzt als Agonist der Proteinkinase C Antitumorwirkung. Zusätzlich stimuliert Bryostatin 1 die Produktion der roten Blutkörperchen, während alle bestehenden Formen der Chemotherapie die Bildung der roten Blutkörperchen inhibieren. Die Substanz befindet sich in Phase II der klinischen Tests als Wirkstoff gegen Melanome, Non-Hodgkins Lymphome und Nierentumore.

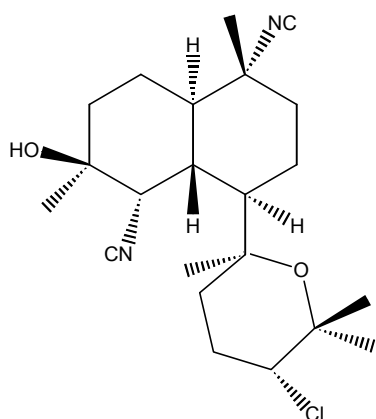
Ecteinascidin 743 wurde in geringer Ausbeute (10^{-4} %) aus dem Manteltierchen *Ecteinascida turbinata* isoliert [Rinehart et al., 1990; Wright et al., 1990]. Die Antitumoraktivität der Extrakte aus *Ecteinascida turbinata* sind schon seit 1969 bekannt [Sigel et al., 1969], doch gestaltete sich die Aufreinigung und Strukturaufklärung als sehr schwierig. Ecteinascidin 743 zeigt starke *in vivo* Aktivität gegen Leukämie, Melanome, Eierstock- und Lungentumore. Es befindet sich zur Zeit in Phase II der klinischen Tests.

Pseudopterosin E wurde aus der Hornkoralle *Pseudopterogorgia elisabethae* isoliert und wirkt entzündungshemmend und schmerzlindernd. Gleichzeitig zeigt es in Mäusen bis zu 300 mg/kg Körpergewicht keine toxischen Nebenwirkungen [Roussis et al., 1990]. Die Hautcreme "Resilience" von Estée Lauder enthält Pseudopterosin E als Additiv zur Abmilderung von entzündlichen Hautschädigungen. Diese kommerzielle Entwicklung hatte die Ernte von über 5000 kg der Hornkoralle *Pseudopterogorgia elisabethae* zur Folge. Dies war der erste wirkliche Test der Ernte eines marinen Invertebraten im großen Maßstab. Dabei werden die Hornkorallen, die zwischen 15 und 25 m Tiefe vorkommen, entlang eines 100 km langen Küstenstreifens der Bahamas per Hand geerntet. Nach etwa 18 Monaten haben sich die Bestände erholt, so dass erneut geerntet werden kann [Faulkner, 2000b].

**Bryostatin 1****Ecteinascidin 743****Pseudopecterosin E****Abbildung I.1:** Die marinen Naturstoffe Bryostatin 1, Ecteinascidin 743 und Pseudopecterosin E.

Unter den Invertebraten stellen die Schwämme eine besonders vielversprechende Quelle bioaktiver Naturstoffe dar. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl neuartiger pharmakologisch interessanter Substanzen aus marinen Schwämmen isoliert.

Der Schwamm *Acanthella cavernosa* produziert die Diterpenoide Kalihinol A, das eine hohe Antimalaria-Aktivität (EC_{50} -Wert = $1.2 \cdot 10^{-9}$ M) besitzt [Miyaoaka et al., 1998] und die Kalihinene X, Y und Z, die die Besiedlung und Metamorphose der Larven des Krebses *Balanus amphitrite* (anti-fouling) inhibieren [Fusetani et al., 1996]. Der Schwamm *Acanthella carteri* produziert das bioaktive Alkaloid Hanishin, das das Wachstum der humanen Lungenkrebszelllinie NSCLC-N6 inhibiert (IC_{50} -Wert = $9.7 \mu\text{g/ml}$) [Mancini et al., 1997]. Die beschriebenen Wirkstoffe sind in der Abbildung I.2 dargestellt.



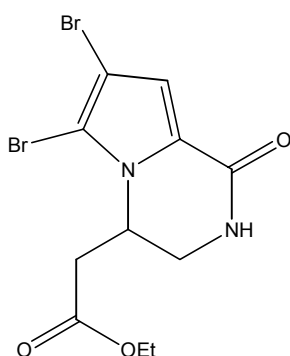
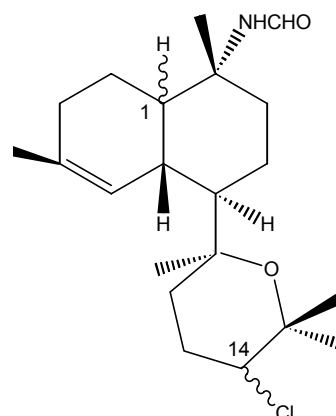
Kalihinol A

Kalihinene

X: $1\beta\text{-H}$, $14\alpha\text{-Cl}$

Y: $1\alpha\text{-H}$, $14\alpha\text{-Cl}$

Z: $1\beta\text{-H}$, $14\beta\text{-Cl}$



Hanishin

Abbildung I.2: Kalihinol A, Kalihinene X,Y und Z und Hanishin.

Zytotoxische Wirkung gegen verschiedene menschliche Krebszelllinien wurden bei den stickstoffhaltigen Metaboliten Asmarin A-C (Abbildung I.3) aus dem tropischen Schwamm *Raspailia* spec. nachgewiesen [Yosief et al., 1998]. Zahlreich sind auch die Strukturen neuartiger bioaktiver Peptide, die zum Teil erhebliche zytotoxische Wirkungen aufweisen [Bewley and Faulkner, 1998; Fusetani et al., 1993].

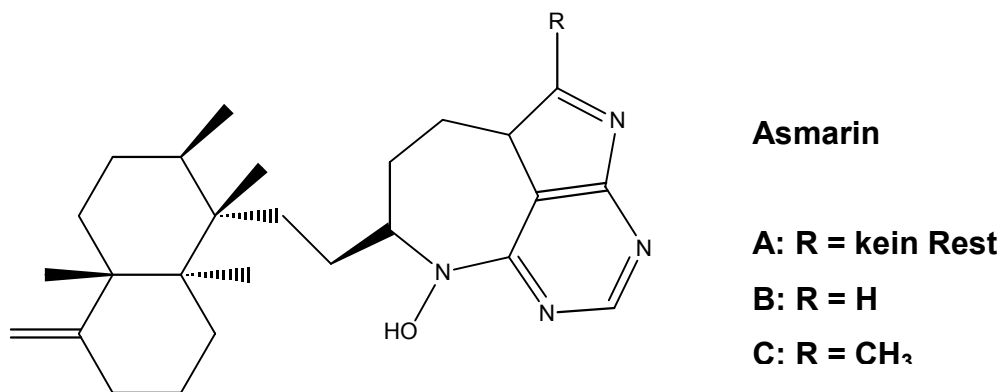
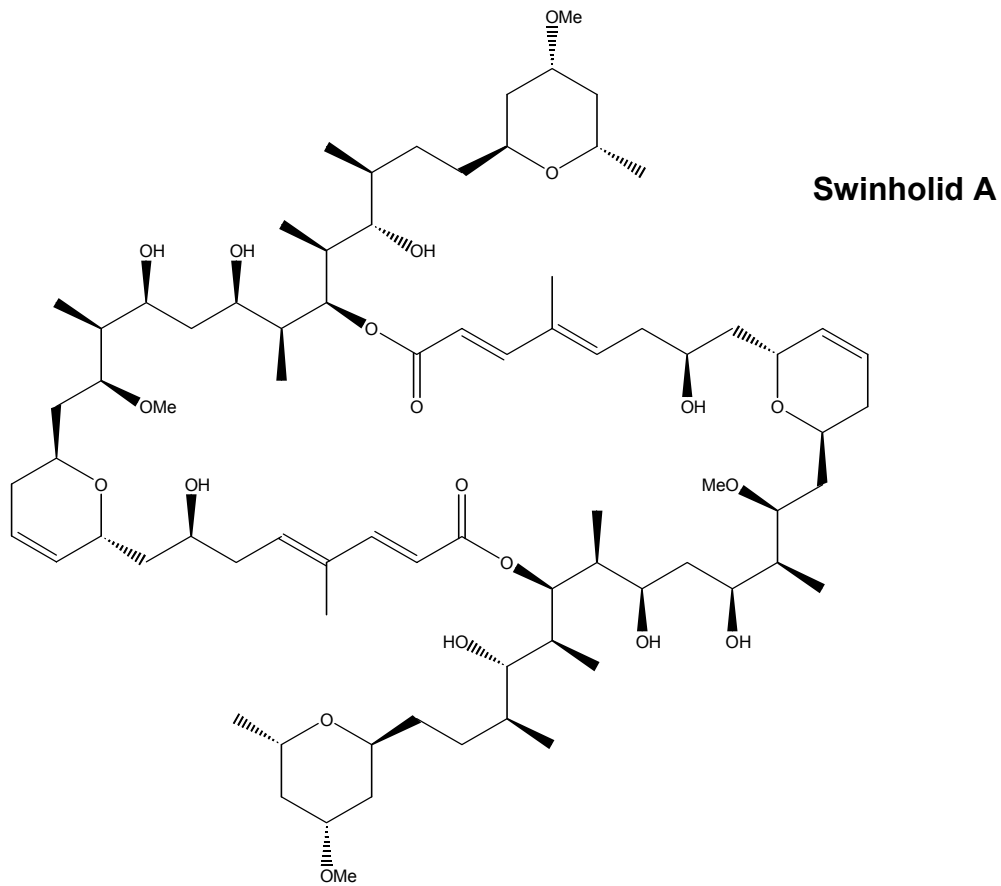


Abbildung I.3: Asmarin A, B und C aus dem Schwamm *Raspailia* spec.

In der Literatur mehren sich die Hinweise, dass Metaboliten, die aus Schwämmen isoliert wurden, ursprünglich von in den Schwämmen lebenden Mikroorganismen stammen könnten. Da Schwämme immer in Gemeinschaft mit Mikroorganismen leben, ist eine Beteiligung letzterer an der Produktion von bioaktiven Metaboliten nicht auszuschließen. Dafür spricht die verhältnismäßig geringe Menge an gebildeten Substanzen, ihr Vorkommen in mehreren Schwämmen verschiedener Arten und spezielle für Mikroorganismen charakteristische strukturelle Merkmale [Kobayashi und Ishibashi, 1993].

Beispielsweise konnten Diketopiperazine nicht nur aus dem Schwamm *Tedania ignis*, sondern auch aus dem mit dem Schwamm assoziierten Bakterium *Micrococcus* spec. isoliert werden. Dadurch konnte die eigentliche Herkunft der Metabolite geklärt werden [Stierle et al., 1988].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die in Abbildung I.4 dargestellten bioaktiven Metabolite Swinholid A (Macrolacton) und Theopalauamid (Bicyclisches Peptid) aus dem Steinschwamm *Theonella swinhoei* auch in nicht vernachlässigbaren Konzentrationen in symbiontischen einzelligen und filamentösen Bakterien lokalisiert sind und dass sie vermutlich auch von den Symbionten produziert werden [Bewley and Faulkner, 1998].



Theopalauamid

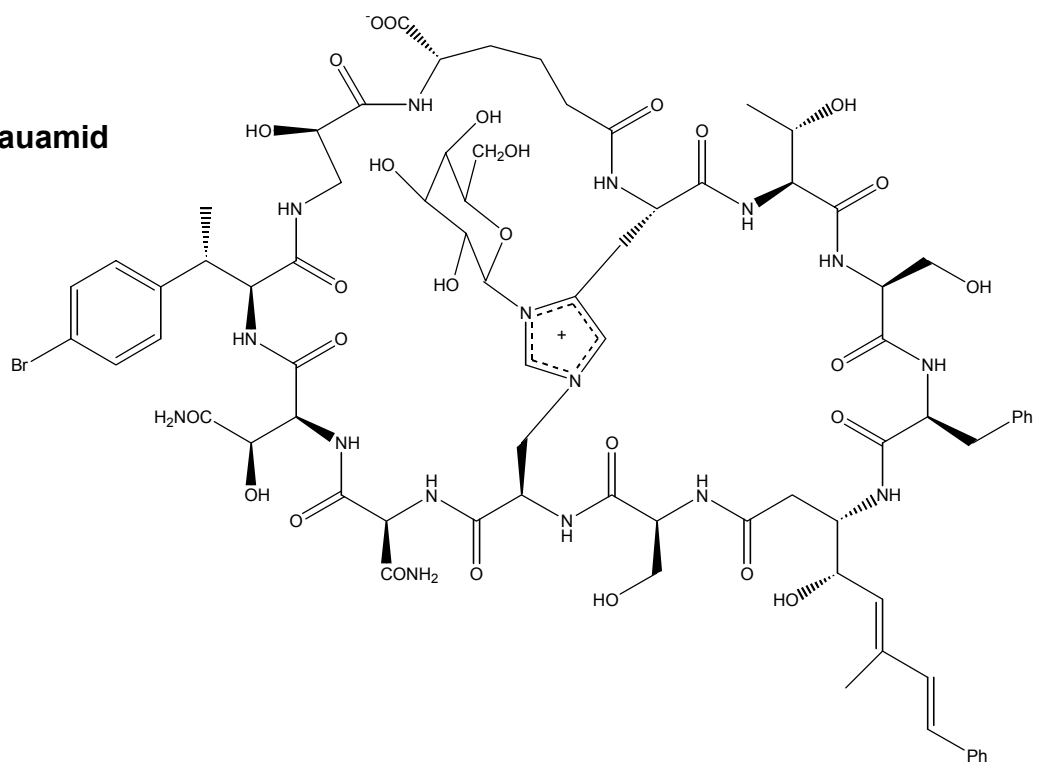


Abbildung I.4: Swinholid A und Theopalauamid aus dem Steinschwamm *Theonella swinhoei*.

Aufgrund dieser Zusammenhänge erscheint es sinnvoll, schwamm-assoziierte oder mit anderen Invertebraten in Gemeinschaft lebende marine Mikroorganismen als Naturstoffquelle zu testen. Denn im Vergleich zu den Invertebraten sind die marinen Mikroorganismen ohne Raubbau an den natürlichen Ressourcen des Meeres zu gewinnen, da sie nach der Isolierung in Bioreaktoren massenhaft kultivierbar und auch gentechnologischen Verfahren zum Zwecke der Optimierung der Produktbildung zugänglich sind. Dabei stellt jedoch die Isolierung der einzelnen Stämme ein großes Problem dar, weil nur etwa 1 % aller marinen Mikroorganismen mit den gängigen Methoden kultivierbar sind [Jensen et al., 1996].

Fortschritte in der Biotechnologie, besonders die Fähigkeit genetisches Material von einem Bakterium zu einem anderen zu übertragen, eröffnen nun die Möglichkeit verschiedene Segmente der DNA, die für die Biosynthese der Sekundärmetabolite verantwortlich sind, von unkultivierbaren Bakterien auf einfach kultivierbare Mikroorganismen, z.B. *Escherichia coli* zu übertragen [Faulkner, 2000b].

Das **Ziel der vorliegenden Arbeit** lag in der Suche nach bioaktiven Naturstoffen aus schwamm-assoziierten marinen Mikroorganismen. Angesichts der dargestellten Vielfalt wurde ein Schwamm der Gattung *Acanthella* als Quelle für die im Screening eingesetzten Mikroorganismen gewählt. Am Beispiel der aus dem Schwamm *Acanthella acuta* gewonnenen bakteriellen Isolate von *Psychroflexus* spec. und *Bacillus subtilis* sollte der Einfluss auf das Wachstum und die Bildung von Naturstoffen untersucht werden. Dabei sollte der Einfluss des Mediums und der äußeren Kultivierungsparameter Temperatur, pH und Sauerstoffeintrag auf das Wachstum und die Produktion mehrerer Metabolite optimiert werden. Zusätzlich sollten die aufgereinigten Naturstoffe hinsichtlich ihrer Bioaktivität und ihrer physiko-chemischen Eigenschaften charakterisiert werden. Schließlich sollten bioaktive Naturstoffe durch enzymatische Modifikation in ihrer Wirksamkeit verbessert und neue Substanzklassen dargestellt werden.

II Material und Methoden

1. Mikroorganismen

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Mikroorganismen handelt es sich um Eigenisolate aus dem marinen Schwamm *Acanthella acuta*, der im August 1997 vor der Küste Kretas geerntet wurde (W. Schatton, Fa. Klinipharma, Frankfurt). Zwei dieser isolierten Reinkulturen wurden bei der DSMZ/Braunschweig bzw. Frau Dr. I. Wagner-Döbler/GBF Braunschweig einem Vergleich der diagnostischen Sequenzen der 16S rRNA mit den bekannten Spezies unterworfen. Aufgrund dieser Ergebnisse konnten die beiden Eigenisolate der Gattung *Psychroflexus* spec. bzw. der Art *Bacillus subtilis* zugeordnet werden. Auf die beiden Mikroorganismen wird im Ergebnisteil näher eingegangen.

Bei allen übrigen Eigenisolaten erfolgte eine qualitative Beschreibung der morphologischen Merkmale mittels Mikroskop, eine Angabe der Farbe und anderer äußerer Erscheinungen der Kulturen während des Wachstums sowie die Untersuchung der physiologischen Eigenschaften.

1.1 Isolierung der Mikroorganismen

Die Schwammprobe *Acanthella acuta* wurde nach Erhalt unter sterilen Bedingungen sofort weiter behandelt. Mit Hilfe von Mörser, Pistil und Pipette wurde der Schwamm ausgepresst und die erhaltene Flüssigkeit auf vorbereitete MB-Agarplatten mittels Drigalskispatel ausplattiert. In einem weiteren Ansatz wurden 500 µl der ausgepressten Flüssigkeit in 100 ml Flüssigmedium MB gegeben und bei 100 Upm inkubiert. Als Parameter wurden Temperatur und Medium variiert. Von der Flüssigkultur wurden täglich 500 µl auf eine Agarplatte überimpft und ausplattiert. Die gewachsenen Bakterien wurden täglich von der Agarplatte entfernt und auf eine neue überimpft. Die Aufreinigung der einzelnen Bakterienisolate erfolgte durch Reinigungsausstriche oder durch Verdünnungsausstriche über fünf Platten.

1.2 Gram-Verhalten

Das Gram-Verhalten wurde mit KOH (5 %ig) getestet. Auf einem Objektträger wurde ein Tropfen KOH-Lösung und eine Impföse Bakterienkultur aufgebracht. Mit der Impföse wurde die KOH-Lösung in die Bakterienkultur überführt und verrieben. Mit KOH werden Lipopolysaccharide aus der Bakterienzellwand gelöst. Beim Hochziehen der Nadel werden bei gramnegativen Bakterien aufgrund der zähen klebrigen Konsistenz der Lipopolysaccharide Fäden erkennbar. Bei grampositiven Bakterien sind keine Fäden erkennbar.

1.3 Oxidasetest

Der Oxidasetest wurde zur Unterscheidung von oxidativ-fermentativen, gramnegativen Bakterien von Enterobakterien durchgeführt. Das Enzym Cytochromoxidase wird durch die Oxidation von Dimethylparaphenylendiamin und Naphthol unter Bildung von Indophenolblau nachgewiesen. Das Bakterienisolat wurde auf einem Teststreifen (Bactident[®] Oxidase, Firma Merck, Darmstadt) verrieben. Oxidase-positive Bakterien färben sich innerhalb von 30 - 60 Sekunden blau. Später eintretende Blaufärbung gilt als negativ.

1.4 BBL[®] Oxi/Ferm[™] Tube II

Zur Identifizierung von Bakterien aus der Gruppe der oxidativ-fermentativen, gramnegativen Stäbchen wurde das Testsystem BBL[®] Oxi/Ferm[™] Tube II (Becton Dickinson, Cockeysville, Maryland, USA) verwendet. Die in 12 Kammern des Teströhrchens befindlichen Spezialmedien ermöglichen den gleichzeitigen Nachweis von 14 verschiedenen biochemischen Eigenschaften. Nach 48 h Bebrütung wurde der Test durch Vergleich mit einem Standardbild ausgewertet.

1.5 BBL® Enterotube II

Zur Identifizierung von aeroben, fakultativ anaeroben, gramnegativen, Oxidase-negativen Stäbchen (Enterobacteriaceae) wurde das Testsystem BBL® Enterotube II (Becton Dickinson, Cockeysville, Maryland, USA) verwendet. Die in den Kammern des Teströhrchens befindlichen Spezialmedien ermöglichen den gleichzeitigen Nachweis von 15 verschiedenen biochemischen Eigenschaften der Bakterien. Nach 24 h Bebrütung wurde der Test durch Vergleich mit einem Standardbild ausgewertet.

1.6 BBL® Crystal™

Zur Identifizierung von grampositiven Bakterien wurde das Mikrotestsystem BBL® Crystal™ (Becton Dickinson, Cockeysville, Maryland, USA) verwendet, das modifizierte fluorogene und chromogene Substrate enthielt. Ein Bakterienisolat wurde in Inokulumsflüssigkeit suspendiert und in die Reaktionskammer überführt. Das Reaktionsgefäß wurde bei 27°C für 18 bis 24 h inkubiert. Anschließend wurden die einzelnen Reaktionen auf Farbumschläge und Fluoreszenz untersucht und ausgewertet.

2. Chemikalien

Neben den anschließend aufgeführten Chemikalien wurden analysenreine Substanzen folgender Firmen verwendet:

- Aldrich, Steinheim
- Fluka, Neu-Ulm
- Merck, Darmstadt
- Riedel de Haën, Seelze
- Serva, Heidelberg
- Sigma, München

2.1 Chemikalien für Nährmedien

- | | |
|-----------------------------------------|---------------------------------|
| • Marine Broth | Difco-Laboratories, Detroit/USA |
| • Bacto Pepton | Difco-Laboratories, Detroit/USA |
| • Nutrient Broth | Difco-Laboratories, Detroit/USA |
| • Hefeextrakt | Difco-Laboratories, Detroit/USA |
| • Bacto Agar | Difco-Laboratories, Detroit/USA |
| • Malzextrakt | Difco-Laboratories, Detroit/USA |
| • Technischer Hefeextrakt | Ohly Chemie, Hamburg |
| • Cerelese (Glucose * H ₂ O) | Cerestar, Krefeld |

3. Nährmedien

Tabelle II.1: Zusammenstellung der verwendeten Komplexmedien.

| Medium | Zusammensetzung | pH-Wert | geeignet für |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------|-----------|------------------|
| Marine Broth | 37.4 g/l Marine Broth | 7.0 – 7.5 | marine Bakterien |
| Nutrient Broth | 8.5 g/l Nutrient Broth | 7.5 | Bakterien |
| CP | Hefeextrakt 10 g/l Cerelose 10 g/l | 6.2 | Algen |
| MPY | Malzextrakt 20 g/l Bacto Pepton 2.5 g/l Hefeextrakt 2.5 g/l | 5.0 - 7.5 | Pilze |

Synthetisches Meerwassermedium SM1 [Passeri et al., 1992]

Mineralsalze:

| | |
|---------------------------------------|-----------|
| NaCl | 23.00 g/l |
| KCl | 0.75 g/l |
| CaCl ₂ *2 H ₂ O | 1.47 g/l |
| MgCl ₂ *6 H ₂ O | 5.08 g/l |
| MgSO ₄ *7 H ₂ O | 6.16 g/l |

Zusätze:

| | |
|------------------------------------------------------|-----------|
| Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O | 0.89 g/l |
| FeSO ₄ *7 H ₂ O | 0.03 g/l |
| Glucose | 20.00 g/l |
| NH ₄ Cl | 5.00 g/l |

pH mit NaOH auf 7.5 einstellen

Alle Nährmedien wurden 20 Minuten bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Glucose und andere verwendete C-Quellen wurden getrennt sterilisiert und anschließend dem Medium aseptisch zugegeben. Zur Herstellung von Agarplatten wird dem Medium jeweils 18 g/l Bacto Agar hinzugefügt.

4. Kulturführung

4.1 Stammkulturen

Zur Stammhaltung der isolierten Mikroorganismen wurden Schrägagarröhrchen verwendet, die jeweils mit 7 ml Marine Broth-Agar gefüllt waren. Nach dem Beimpfen mit der Reinkultur wurden die Röhrchen bei 27°C für 72 h inkubiert. Anschließend wurden die Schrägagarröhrchen luftdicht verschlossen und bei 4°C für vier Wochen aufbewahrt.

4.2 Glycerinkonserve

Eine frische Schrägagarkultur wurde mit 5 ml sterilem Phosphatpuffer (50 mM, pH 7.2) aufgeschwemmt und 1 ml dieser Suspension in ein steriles, vorgekühltes mit 4 ml Glycerin (60 %) gefülltes Schraubkappenröhrchen überführt, vermischt und bei - 20°C eingelagert. Das Röhrchen wurde für sechs Monate aufbewahrt.

4.3 Stickstoffkonserve

Ein frisch beimpftes gut bewachsenes Schrägagarröhrchen wurde mit 5 ml Lagermedium (10 % Glycerin (w/v) und 10 % Magermilchpulver (w/v) in wässriger Lösung) aufgeschlemmt, je 1.5 ml dieser Suspension in Plastikampullen pipettiert, bei - 70°C 2 h vorgefroren und anschließend in flüssigen Stickstoff eingelagert.

5. Kultivierungen im Schüttelkolben

Die Untersuchungen zur Mediumszusammensetzung, Wachstumsoptimierung sowie zur Bildung von biologisch aktiven Substanzen wurden als Submerskultivierungen in Erlenmeyerkolben mit Schikanen durchgeführt. Je nach Versuchsbedingungen wurden Größe des Schüttelkolbens und Inkubationstemperatur variiert. Die Inkubation erfolgte bei 100 Upm auf einer Rotationsschüttelmaschine (Braun Biotech, Melsungen).

5.1 Vorkultur

Mit einer Impföse wurde Zellmaterial von einer Schrägagarkultur auf 100 ml steriles MB-Medium in 500 ml Schüttelkolben überimpft. Die Inkubation erfolgte bei 30°C und 100 Upm im Dunkeln. Die Inkubationsdauer variierte bei verschiedenen Bakterienstämmen.

5.2 Hauptkultur

Für die Hauptkultivierungen wurden Schüttelkolben von 500 ml, 1 l und 2 l verwendet und mit 100 ml, 200 ml bzw. 500 ml Medium gefüllt. Als Inokulum wurde 2 % der Vorkultur hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte bei 100 Upm im Dunkeln. Alle weiteren Parameter wurden den jeweiligen Versuchsbedingungen angepasst.

6. Kultivierungen im Bioreaktor

6.1 50 l Bioreaktor

Die Vorkulturen für die Bioreaktorkultivierungen wurden wie in 5.1 beschrieben hergestellt. Als Inokulum wurde 5 % des Reaktorvolumens eingesetzt. Es wurden Versuche in einem 50 l Bioreaktor (Biostat U50D, B. Braun, Biotech International, Melsungen) durchgeführt. Als Rührsystem wurde ein Scheibenrührer mit vier Strombrechern (Rushton-Turbine) verwendet. Sowohl der Sauerstoffpartialdruck (äquivalent zur Konzentration des gelösten O₂ im Medium), der mit einer polarographischen Sauerstoffelektrode (Ingold) bestimmt wurde, als auch der pH-Wert (pH-Elektrode InFit 764-50, Ingold) wurden online gemessen. Bei den einzelnen Versuchen wurden folgende Parameter konstant gehalten:

| | |
|---------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| Rührsystem | Rushton-Turbinen |
| Drehzahl | 500 Upm |
| Temperatur | 30°C |
| pH | 7.5 +/- 0.2 (Regulation mit 10 % NaOH und 10 % H ₃ PO ₄) |
| Schaumunterdrückung | steriles Brenntag Ucolub N 115, Polyalkylenglycol (Brenntag Mineralöl GmbH, Mühlheim) |
| Probenahmesystem | automatisches Probenahmesystem mit Kühlung auf 3°C |
| Flüssigkeitsvolumen | 30 l |

7. Kultivierungsparameter

7.1 Zelldichte

Die Zelldichten der Kulturen wurden durch Trübungsmessungen in einem Spektralphotometer (Pharmacia LKB, Ultrospec II) bei einer Wellenlänge von 546 nm gegen dest. H₂O als Blindprobe bestimmt. Die Messungen erfolgten in Kunststoffküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Bei hohen Zelldichten wurde die Kulturbrühe mit dest. H₂O soweit verdünnt, dass die gemessene Extinktion zwischen 0.2 und 0.5 lag.

7.2 Biotrockenmasse

Vorgewogene Metallbecher wurden jeweils mit 10 ml Kulturbrühe gefüllt und 20 min bei 13000 Upm und 4°C zentrifugiert (Sigma, 3MK). Nach dem Dekantieren des Überstands wurden die Pellets mit 0.9 %iger NaCl-Lösung gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden sie bis zur Gewichtskonstanz (24 h) bei 105°C getrocknet und anschließend ausgewogen.

7.3 Abgasanalyse

Die Reaktorabluft wurde direkt einem Gerät zur Abgasanalyse (Firma Maihak, Hamburg) zugeführt. CO₂ wurde anhand seiner Absorption im Infrarot-Bereich (Unor 6N) und O₂ anhand seiner paramagnetischen Eigenschaften (Oxigor 6N) quantifiziert. Die Messung des CO₂- und O₂-Gehaltes in der Abluft bei Bioreaktorkultivierungen ermöglichte mit Hilfe der quasi-stationären Inertgasbilanz die Berechnung der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxidbildungsrate. Da in einem Batch-Prozess keine stationären Zustände existieren, wurden differentiell kleine Zeitintervalle herausgegriffen und als quasi-stationär bezeichnet. Diese Annäherung war möglich, weil die Zeit für eine Abgasmessung sehr kurz gegenüber

der gleichzeitigen Biomasseänderung war. Folgende Bedingungen werden für die Bilanzierung unterstellt:

- Die Zuluft besteht nur aus Sauerstoff, Stickstoff und Kohlendioxid
- Das Gasgemisch zeigt ideales Gasverhalten
- Das Gasgemisch ist trocken und liegt im Normalzustand vor (1 bar, 273 K)
- Der Volumenstrom V' ist konstant und bekannt

Aus den durch die Abgasanalyse zugänglichen Stoffmengenanteilen von Sauerstoff und Kohlendioxid ergeben sich über folgende Zusammenhänge die Sauerstoffaufnahme Q_{O_2} und die Kohlendioxidbildungsrate Q_{CO_2} :

$$Q_{O_2} = \frac{V'^N \cdot p^N \cdot X_{O_2}^E \cdot M_{O_2}}{V_F \cdot R \cdot T^N} \cdot \left(1 - \frac{X_{O_2}^A (1 - X_{O_2}^E - X_{CO_2}^E)}{X_{O_2}^E (1 - X_{O_2}^A - X_{CO_2}^A)} \right) \quad (1)$$

$$Q_{CO_2} = \frac{V'^N \cdot p^N \cdot X_{CO_2}^E \cdot M_{CO_2}}{V_F \cdot R \cdot T^N} \cdot \left(1 - \frac{X_{CO_2}^A (1 - X_{O_2}^E - X_{CO_2}^E)}{X_{CO_2}^E (1 - X_{O_2}^A - X_{CO_2}^A)} \right) \quad (2)$$

Der respiratorische Quotient RQ ergibt sich aus den stoffmengenbezogenen Größen $q_{CO_2} = Q_{CO_2}/M_{CO_2}$ sowie $q_{O_2} = Q_{O_2}/M_{O_2}$:

$$RQ = q_{CO_2}/q_{O_2} \quad (3)$$

| | | |
|-----------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Q_{O_2} [g/ l h] | = | Sauerstoffaufnahme |
| Q_{CO_2} [g/ l h] | = | Kohlendioxidbildungsrate |
| RQ | = | Respiratorischer Quotient |
| q_{O_2} [mol/ l h] | = | molare Sauerstoffaufnahme |
| q_{CO_2} [mol/ l h] | = | molare Kohlendioxidbildungsrate |
| V [l/ h] | = | Volumenstrom |
| V_F [l] | = | Flüssigkeitsvolumen |
| P [bar] | = | Druck |
| R [bar l/ K mol] | = | allg. Gaskonstante = $8.314 \cdot 10^{-2}$ bar l/ K mol |
| T [K] | = | Temperatur |
| M [g/ mol] | = | Molekulargewicht |
| X_{O_2, N_2, CO_2} | = | Stoffmengenanteil in der Zuluft |
| | $X_{O_2}^E$ | = 0.20946 |
| | $X_{CO_2}^E$ | = 0.00033 |
| | $X_{N_2}^E$ | = 0.79 |
| E: | Eingang | |
| A: | Ausgang | |
| N: | Normverhältnisse bzw. Standardverhältnisse (273.15 K, 1 bar) | |

7.4 Wachstumsrate, Ertrags- und Ausbeutekoeffizienten

Tabelle II.2: Zusammenstellung der berechenbaren Koeffizienten.

| | Definition | Berechnung |
|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| Maximale spezifische Wachstumsrate μ_{max} | Zellmassenbildung pro Zeit | $\mu_{max} = \frac{\ln(m_x(t_n) / m_x(t_0))}{t_n - t_0}$ |
| Ertragskoeffizient $Y_{x/s}$ | Verhältnis von Zellbildung und Substratverbrauch | $Y_{x/s} = \frac{m_x(t_1) - m_x(t_0)}{m_s(t_0) - m_s(t_1)}$ |
| Produktertragskoeffizient $Y_{p/x}$ (spezifische Produktbildung) | Quotient aus Produkt und Biomasse | $Y_{p/x} = \frac{m_p(t_1) - m_x(t_0)}{m_x(t_1) - m_x(t_0)}$ |
| Ausbeutekoeffizient $Y_{p/s}$ | Quotient aus Produkt und Substratverbrauch | $Y_{p/s} = \frac{m_p(t_1) - m_x(t_0)}{m_s(t_0) - m_s(t_1)}$ |

$m_x(t_1, t_0)$ = BTM der Kultur zum jeweiligen Zeitpunkt

$m_s(t_1, t_0)$ = Substratmenge in der Kultur zum jeweiligen Zeitpunkt

$m_p(t_1, t_0)$ = Produktmenge in der Kultur zum jeweiligen Zeitpunkt

t_n, t_0 = Zeit [h]

8. Analytik

8.1 Glucosekonzentration

Die Glucosebestimmung wurde mit dem Accutend® Glucose Analyzer (Boehringer Mannheim) durchgeführt. 800 µl Kulturüberstand wurden mit 200 µl Phosphatpuffer (pH 7.0) durchmischt. Davon wurden 20 µl bei Raumtemperatur auf Einwegmessstreifen aufgegeben, die immobilisierte Glucose-Oxidase enthalten und eine Umsetzung hervorrufen. Die Glucosekonzentration kann dann auf reflexionsphotometrischem Wege quantitativ erfasst werden. Der Messbereich erstreckt sich von ca. 0.5 – 5.0 g/l.

8.2 Proteinkonzentration

Zur Bestimmung des Zellproteins wurde zuerst ein Zellaufschluss nach Näveke und Tepper [Näveke und Tepper, 1986] durchgeführt und der Proteingehalt der aufgeschlossenen Proben bestimmt. Für den Aufschluss wurden zuvor 1 ml Kultursuspension 5 min bei 13000 Upm an einer Eppendorf Centrifuge 5415 zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml 1 N Natronlauge resuspendiert, 20 min im Thermoblock auf 95°C erhitzt und nach Abkühlung auf Raumtemperatur 5 min intensiv gevortext und erneut zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde (ggf. nach vorheriger Verdünnung) in dem folgenden Test eingesetzt. Der Proteingehalt wurde nach folgenden Methoden bestimmt:

LOWRY [Lowry et al., 1951]

Reagenzien:

- Lsg. A: 20 g/l Na_2CO_3 in 0.1 N NaOH
- Lsg. B: 10 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$
- Lsg. C: 20 g/l Kalium-Natriumtartrat
- Lsg. D: Folin-Reagenz, 1:2 verdünnt
- Lsg. E: Gebrauchsreagenz, das täglich frisch durch Mischen von 0.5 ml Lsg. C mit 50 ml Lsg. A und anschließender Zugabe von 0.5 ml Lsg. B zubereitet wurde.

200 µl jeder Probe wurden mit 2 ml Lsg. E versetzt, gemischt und bei 30°C für 10 min inkubiert. Dann wurden 200 µl Lsg. D hinzugegeben, sofort auf dem Vortex gemischt und weitere 30 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion der Probe bei 660 nm an einem Spektralphotometer gegen einen Blindwert mit 200 µl H₂O statt Probe gemessen. Zunächst musste der Linearitätsbereich ermittelt werden, indem eine Kalibrierkurve über einen bestimmten Konzentrationsbereich erstellt wurde. Für den Konzentrationsbereich zwischen 25 und 800 mg/l wurde eine Kalibrierkurve mit Rinderserumalbumin gemessen und zur quantitativen Proteinbestimmung genutzt.

BRADFORD [Bradford, 1976]

Reagenzien:

| | |
|--------|--------------------------------|
| 100 mg | Coomassie Blue G250 |
| 50 ml | Methanol |
| 100 ml | H ₃ PO ₄ |

auf 1l mit dest. H₂O auffüllen (Aufbewahrung: kühl und dunkel)

200 µl Probe und 800 µl Reagenz wurden in einer Küvette gemischt und nach 10 min Wartezeit bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gemessen. Diese Methode umfasst einen Messbereich bis maximal 100 µg/ml Protein. Verdünnungen bei höheren Proteinkonzentrationen wurden mit isotonischer Kochsalzlösung vorgenommen. In der Blindprobe wurde das Probenvolumen durch 200 µl isotonische Kochsalzlösung ersetzt. Die Kalibration erfolgte mit Rinderserumalbumin als Standardprotein.

8.3 Ammoniumkonzentration

Die Ammoniumkonzentration wurde nach der Methode von Fawcett und Scott [Fawcett und Scott, 1960] bestimmt.

Reagenzien:

| | |
|-----------|--------------------------------------------------------------|
| Lösung A: | 9.98 g/l Phenol + 0.0506 g/l Na-Nitroprussid |
| Lösung B: | 0.5 ml 13 %ige Na-Hypochloritlösung + 25 ml H ₂ O |

40 µl Kulturüberstand wurden mit 1 ml Lösung A in einem Reagenzglas gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 1 ml Lösung B gestartet. Die Lösungen wurden 15 min bei 37°C inkubiert, 15 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend bei 546 nm gegen eine Blindprobe (Probe durch dest. H₂O ersetzt) mit einem Spektralphotometer die Extinktion gemessen. Durch Aufnahme einer Kalibrationsgeraden mit Ammoniumsulfat wurden die Probenkonzentrationen ermittelt (Konzentrationsbereich von 0.2 bis 2.0 mmol/l).

8.4 Stickstoffkonzentration

Die Gesamtstickstoffkonzentration im Kulturüberstand wurde mit dem Fertigtest LATON® Küvettentest LCK 338 (Firma Dr. Lange, Frankfurt) bestimmt. Anorganisch und organisch gebundener Stickstoff wird durch Aufschluss mit Peroxodisulfat zu Nitrat oxidiert. Nitrationen reagieren in schwefel- und phosphorsaurer Lösung mit 2,6-Dimethylphenol zu Nitrophenol, dessen Extinktion bei 370 nm mit einem Dr. Lange-Photometer gemessen wurde. Der Messbereich erstreckt sich von 25 – 125 mg/l Gesamtstickstoff.

8.5 Phosphatkonzentration

Die Bestimmung der Phosphatkonzentration im Kulturüberstand erfolgte mit dem Phosphor-Test (PMB) 14848 (Merck). Orthophosphat-Ionen bilden mit Molybdat-Ionen in schwefelsaurer Lösung Molybdatophosphorsäure. Diese wird mit Ascorbinsäure zu Phosphormolybdänblau reduziert, das dann photometrisch bei einer Wellenlänge von 712 nm bestimmt wurde.

9. Aufreinigung und Charakterisierung von Metaboliten

9.1 Kulturaufarbeitung

Nach Beendigung der Kultivierung wurde die Kulturbrühe 20 min bei 13000 Upm abzentrifugiert (Varifuge F, Heraeus), das Sediment mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und erneut abzentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen gefriergetrocknet und mit 100 ml MeOH aufgenommen und 12 h gerührt, um die Zellen aufzuschließen. Nach Abfiltration, Nachspülung mit Lösungsmittel, Einengung am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck, Aufnahme des Rückstands mit 5 ml MeOH wurde der Extrakt in Sovirelröhrchen überführt. Die so erhaltenen Zell-Rohextrakte wurden getrennt voneinander gesammelt und bei 4°C gelagert.

Der Kulturüberstand wurde dreimal mit dem gleichen Volumen an Ethylacetat extrahiert und die vereinigten Phasen am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde in 2 ml Ethylacetat aufgenommen, in Sovirelröhrchen überführt und bei 4°C aufbewahrt.

9.2 Charakterisierung des Produktspektrums

Um das Produktspektrum in den Rohextrakten von Zellen und Kulturüberstand qualitativ zu beschreiben, wurden Dünnschichtchromatogramme (DC) erstellt. Jeweils 10 µl der gelösten Rohextrakte wurden hierfür im Abstand von je 10 mm auf Kieselgel 60 F₂₅₄ beschichtete Alufolien (Schichtdicke 0.2 mm) der Fa. Merck/Darmstadt aufgetragen und in dem Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser 65/15/2 (v/v/v) entwickelt. Die Detektion der Substanzen erfolgte durch Betrachten im lang- und kurzwelligen UV-Licht (366 nm bzw. 254 nm) sowie durch Anfärben mit folgenden Sprühreagenzien:

- Anisaldehyd [Stahl & Kaltenbach, 1961]
(Frisch bereitete Lösung aus 0.5 ml Anisaldehyd in 50 ml Eisessig unter Zusatz von 1ml konzentrierter Schwefelsäure; nach dem Ansprühen auf 100°C bis zur maximalen Farbintensität der Flecken erwärmen; breites Farbspektrum von grün bis violett)

- α -Naphthol [Jacin et al., 1965]
(Lösung aus: 10.5 ml α -Naphthol-Lösung (15 % in Ethanol), 6.5 ml konzentrierte Schwefelsäure, 40.5 ml Ethanol und 4 ml H₂O; nach dem Ansprühen 3 bis 6 min auf 100°C erwärmen; Zuckerverbindungen erscheinen als lila schwarze Spots)
- Methanol/Schwefelsäure [Anthony et al., 1963]
(Lösung aus: Methanol und H₂SO₄, 1/1; nach dem Ansprühen 3 bis 6 min auf 100°C erwärmen; organische Verbindungen erscheinen als braune Spots)
- 2',7'-Dichlorfluorescein-Aluminiumchlorid-Eisen(III)-chlorid [Dudzinski, 1967]
Sprühlösung I: 2',7'-Dichlorfluoresceinlösung (0.05 % in Ethanol (95 %))
Sprühlösung II: Aluminiumchloridlösung (1 % in Ethanol)
Sprühlösung III: Eisen(III)-chloridlösung (1 % in Wasser)
Mit I, dann mit II und schließlich mit III besprühen. Nach jedem Sprühen einige Minuten auf ca. 100°C erwärmen; freie Fettsäuren erscheinen als rosa-violette Flecken auf fahlgelbem Hintergrund

9.3 Quantitative Bestimmung

Zunächst wurde ein Dünnschichtchromatogramm erstellt, auf dem zusätzlich zu den Proben jeweils 6 Standards verschiedener Konzentrationen der zu bestimmenden Substanz mitgeführt wurden. Die detektierten DC-Karten wurden anschließend auf eine Glasplatte geklebt und am Densitometer CD 60 (Desaga/Heidelberg) mittels der Herstellersoftware bei unterschiedlich gewählten Wellenlängen gescannt. Die Quantifizierung der Flecken erfolgte anhand einer Kalibrierkurve, die aus den aufgetragenen Standards berechnet wurde. Folgende Bedingungen und Parameter wurden gewählt:

| | | |
|-------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| Substanz: | Glycoglycerolipid | Glycoglycerin |
| Stationäre Phase: | Kieselgel | Kieselgel |
| Mobile Phase: | CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (65/15/2) (v/v/v) | CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (30/15/1) (v/v/v) |

| | |
|-------------------------------|----------------------------|
| Detektion: | α -Naphthol-Reagenz |
| Wellenlänge: | 580 nm |
| Messart: | Remission/Extinktion |
| Spaltbreite: | 1 mm |
| Spalthöhe: | 8 mm |
| Zahl der Messungen pro Punkt: | 16 |
| Auflösung bei Datenaufnahme: | 0.05 mm |
| Kalibrierung: | Peakfläche |
| Art der Kalibrierung: | Michaelis-Menten-Funktion |

9.4 Präparative Säulenchromatographie

Für eine erste Anreicherung der gewünschten Substanzen wurde die präparative Säulenchromatographie mit Kieselgel 60 gewählt.

| | |
|--------------------------|---------------------------------------|
| Substanz: | Glycoglycerolipide |
| Aufgegebener Rohextrakt: | 2 g |
| Stationäre Phase: | 500 g Kieselgel 60 |
| Mobile Phase: | CHCl ₃ /MeOH (80:20) (v/v) |
| Säulengröße: | l = 50 cm, d = 8 cm |

Die Fraktionsgröße betrug jeweils 10 ml. Die Fraktionen gleichen Inhalts wurden vereinigt und das Lösungsmittel im Vakuum abgezogen. Die Reinheit der gewonnenen Produkte wurde durch Dünnschichtchromatographie überprüft.

9.5 Präparative Schichtchromatographie

Zur weiteren Aufreinigung wurden die durch Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen mit Hilfe der präparativen Schichtchromatographie aufgetrennt. Dabei wurden PSC-Fertigplatten (20x20 cm) (Kieselgel F₂₅₄, Fa. Merck/Darmstadt) verwendet. Es wurden jeweils maximal 100 mg Substanzgemisch linienförmig aufgetragen und entwickelt. Nach dem Trocknen wurde ein schmaler Randstreifen

zur Detektion der zu isolierenden Substanzen mit dem Sprühreagenz angesprüht. Die Substanzbanden wurden abgetragen und mit Lösungsmittel eluiert. Nach Abrotieren des Lösungsmittels am Rotationsverdampfer wurden Produkte erhalten, deren Reinheit mittels DC überprüft wurde.

| | |
|-------------------|------------------------------------------------------------|
| Substanz: | Glycoglycerolipide |
| Stationäre Phase: | Kieselgel 60 |
| Mobile Phase: | CHCl ₃ /MeOH/H ₂ O (30/15/1) (v/v/v) |
| Detektionsmittel: | α -Naphthol-Reagenz |
| Elutionsmittel: | CHCl ₃ /MeOH (2/1) (v/v) |

9.6 Präparative MPLC

Die reinen Glycoglycerolipide wurden mittels Medium Pressure Liquid Chromatography (MPLC) dargestellt. Folgende Trennbedingungen wurden gewählt:

| | |
|---------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| Substanz: | Glycoglycerolipide |
| Trennsäule: | LF 240/10 LiChroprep Si 60 (40-63 μ m), Firma Merck, Darmstadt |
| Mobile Phase: | CHCl ₃ /MeOH (95:5) (v/v) |
| Probenvolumen: | 1 ml |
| Flussrate: | 7.5 ml/min |
| Detektor: | UV-Detektor Gynothek SP-4, Techlab, Erkerode |
| Detektortemperatur: | 85°C |
| Pumpe: | Techlab, Erkerode |

9.7 Kernspinresonanzspektroskopie

Es wurden an einem Bruker ARX 400 und PPX 600 Spektrometer ¹H-NMR-Standardspektren und ¹H-breitbandentkoppelte ¹³C-NMR-Spektren aufgenommen. Zur näheren Bestimmung der Multiplizität der ¹³C-Signale wurden DEPT-Spektren angefertigt. Zur genaueren Zuordnung der ¹H-NMR- und der ¹³C-NMR-Signale wurden für alle Substanzen zweidimensionale (H,H)- und (C,H)-korrelierte Spektren

(COSY) aufgenommen. In allen Fällen wurde Chloroform/Methanol (jeweils deuteriert) 70/30 (v/v) als Lösungsmittel benutzt, als interner Standard diente Tetramethylsilan. Zur Beschreibung der Signalmultiplizitäten wurden folgende Abkürzungen benutzt:

s = Singulett, d = Dublett, t = Triplett, q = Quartett, m = Multiplett

9.8 Massenspektrometrie

Es wurden zwei verschiedene Messarten durchgeführt:

Mit Hilfe der Elektronensprayionisationsmassenspektroskopie (ESI-MS) wurden Negativ- und Positiv-Ionen-Spektren aufgenommen. Zur vollständigen qualitativen Charakterisierung aller Bestandteile, speziell der Fettsäuren, wurden Methanolyse-Extrakte einer kombinierten gaschromatographischen-massenspektroskopischen Analyse unterzogen. Dazu wurde ein Kapillargaschromatograph Modell HRGC 5160 mega series der Firma Carlo Erba (Hofheim/Ts) eingesetzt, der mit einem Quadrupol-Massenspektrometer, Modell MAT 4515 der Firma Finnigan/USA, gekoppelt war.

9.9 Oberflächen- und Grenzflächenspannung

Die Oberflächenspannung σ in wässriger Lösung wurde an einem Tensiometer der Firma MWG Lauda/Lauda-Königshofen, bei 25°C gegen Luft mit Hilfe der Ringmethode ohne Abriß nach DU NOÜY [Adamson, 1982] bis zur Einstellung eines konstanten Kraftverlaufs gemessen. Hierfür wurden jeweils 20 ml der zu messenden Probelösung eingesetzt. Die zur Erstellung einer σ/c -Isotherme benötigte Verdünnungsreihe der Glycoglycerolipide wurde von einer bei 45°C angesetzten und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlten Stammlösung hergestellt.

Eine charakteristische Größe ist hierbei der CMC-Wert (Critical Micelle Concentration), der sich aus einem $\sigma/\log(c)$ -Diagramm bei derjenigen Konzentration

ergibt, oberhalb derer keine weitere Erniedrigung der Oberflächenspannung erreicht werden konnte. Die Flüssigkeitsoberfläche ist in diesem Fall vollständig mit der Testsubstanz belegt, während sich in der Lösung Mizellen ausbilden.

Zur Messung der Grenzflächenspannung γ wurden die Proben mit 10 ml n-Hexadecan überschichtet und ebenfalls bis zur Gleichgewichtseinstellung vermessen.

9.10 Spreitungsverhalten

Das Spreitungsverhalten auf einer Wasseroberfläche wurde mit der Platten-Methode nach Wilhelmy [Stache, 1981] ermittelt. Hierfür wurden 5 mg Substanz (GGL11 bzw. GGL12) auf die Oberfläche von 20 ml dest. H₂O gegeben und der zeitliche Verlauf der Oberflächenspannung durch geeignete Einstellung des Papiervorschubs eines Schreibers (anfänglich 60 cm/min) über zwei Stunden registriert. Bei der Spreitung bildet sich ein Film, der einen als Spreitungsdruck Π_s bezeichneten Oberflächendruck erzeugt. Er ist definiert als Differenz der Oberflächenspannung der reinen Flüssigkeit σ und der filmbedeckten Flüssigkeit σ_F :

$$\Pi_s = \sigma - \sigma_F = \delta\sigma \quad (4)$$

9.11 Emulsionstest

Emulsionsstabilisation

Durch Messung der optischen Dichte einer Emulsion mit einem Spektralphotometer UV – 1100 der Firma Hitachi bei 623 nm wurde das Emulsionsstabilisationsvermögen der Glycoglycerolipide untersucht [Multzsch, 1995]. Es wurden 2 mg Testsubstanz in 4 ml äußerer Phase, ggf. durch Erwärmen, gelöst und nach Zugabe von 100 μ l innerer Phase 1 min intensiv auf dem Vibromix durchmischt. Die

Abnahme der Trübung wurde über drei Stunden auf einem Schreiber registriert. In Tabelle II.3 sind die jeweiligen Testansätze dargestellt.

Tabelle II.3: Testansätze zur Bestimmung der Emulsionsstabilisation durch das Glycoglycerolipid.

| System | Äußere Phase (4.0 ml) | Innere Phase (0.1 ml) |
|--------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Öl in Wasser (Ö/W) | dest. H ₂ O | n-Hexadecan Kerosin Mineralöl |
| Wasser in Öl (W/Ö) | n-Hexadecan Kerosin Mineralöl | dest. H ₂ O |

HLB-Wert Bestimmung

Der HLB-Wert (Hydrophilic Lipophilic Balance) beschreibt zahlenmäßig innerhalb einer vorgegebenen Skala das hydrophile-lipophile Gleichgewicht eines nicht-ionischen Moleküls. Anhand des HLB-Werts eines Tensids lässt sich eine Aussage darüber treffen, ob vornehmlich Ö/W- oder W/Ö-Emulsionen gebildet werden. Theoretisch lässt sich der HLB-Wert über die folgende Formel berechnen:

$$\text{HLB} = 20 \cdot (M_H/M) \quad (5)$$

M_H = Molekulargewicht des hydrophilen Molekülteils
 M = Gesamtmolekulargewicht

Eine experimentielle Bestimmung erfolgte mit einem modifizierten Emulsionstest, bei dem anstelle nur einer hydrophoben Komponente ein definiertes Gemisch von Sojaöl und Cyclohexan in unterschiedlichen Verhältnissen verwendet wurde. Der für jedes dieser Gemische erforderliche HLB-Wert für Ö/W-Emulsionen lässt sich aus folgender Formel berechnen:

$$\%A = (HLB_{\text{erf}} - HLB_B)/(HLB_A - HLB_B) \qquad \%B = 100 - \%A \qquad (6)$$

HLB_{erf} = erforderlicher HLB-Wert

HLB_A = HLB von Cyclohexan = 15

HLB_B = HLB von Sojaöl = 6

Konzentrationsabhängigkeit der Emulsionsbildung

Zur weiteren Charakterisierung des Emulsionsvermögens wurde für eine Ö/W-Emulsion des Systems Cyclohexan/Sojaöl (11.1/88.8) (v/v) bei Raumtemperatur die Emulsionsstabilität in Abhängigkeit verschiedener Konzentrationen an zugesetztem Emulgator (Glycoglycerolipid) getestet. Es wurde ein Konzentrationsbereich von 0 - 2.0 mg/ml untersucht. Die Messung und Datenaufnahme erfolgte wie unter dem Abschnitt Emulsionsstabilisation beschrieben.

10. Chemische und biochemische Methoden

10.1 Alkalische Verseifung des Glycoglycerolipids

Zur Gewinnung des Disaccharidglyceringerüsts wurden 150 mg reines Glycoglycerolipid in 10 ml 0.5 N NaOH 4 h unter Rückfluss erhitzt, abgekühlt und mit 0.5 N H₂SO₄ neutralisiert [Lokotsch, 1994]. Durch Zugabe von 20 ml Methanol konnte der Großteil an Na₂SO₄ bereits durch Filtration abgetrennt werden. Die abgespaltenen Fettsäuren wurden dreimal mit je 20 ml Methyl-tert-butylether extrahiert, das Methanol am Rotationsverdampfer unter vermindertem Druck abgezogen und der Rückstand gefriergetrocknet. Das hydrolysierte Rohprodukt wurde zunächst über einen Kationenaustauscher (DOWEX 50WX8) und nach erneuter Gefriertrocknung über einen Anionenaustauscher (DOWEX 2X8, Firma Serva) aufgereinigt.

10.2 Enzymatische Hydrolyse des Glycoglycerolipids

Die enzymatische Hydrolyse von GGL11 wurde in 50 ml Erlenmeyerkolben, die mit Schliffstopfen verschlossen waren, durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in einem temperierbaren Schüttelwasserbad bei einer Schüttelfrequenz von 100 Upm.

Standardansatz:

| | |
|----------------|------------------------------------------------------------|
| GGL11 | 0.5 mmol |
| Enzym | 200 mg Novozym Lipase 435 aus <i>Candida antarctica</i> |
| Lösungsmittel | 20 ml tert-Amylalkohol (Wassergehalt < 1 %) |
| Temperatur | 55°C |
| Reaktionsdauer | 24-48 h |

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Enzym-Immobilisat über Faltenfilter heiß abfiltriert und dreimal mit wenig tert-Amylalkohol gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abgezogen. Nach Wiederaufnahme des Extraktes mit 10 ml dest. H₂O und 10 ml n-Hexan wurde die wässrige Phase mittels Scheidetrichter abgetrennt und gefriergetrocknet. Die organische Phase mit den freigesetzten Fettsäuren wurde verworfen.

10.3 Enzymatische Acylierung des Glycoglycerins

Die enzymatische Acylierung von GG11 wurde in 50 ml Erlenmeyerkolben, die mit Schliffstopfen verschlossen waren, durchgeführt. Die Inkubation erfolgte in einem temperierbaren Schüttelwasserbad bei einer Schüttelfrequenz von 100 Upm.

Standardansatz:

| | |
|----------------------|------------------------------------------------------------|
| Glycoglycerin (GG11) | 0.15 mmol |
| Fettsäurekomponente | 0.45 mmol |
| Enzym | 100 mg Novozym Lipase 435 aus <i>Candida antarctica</i> |
| Lösungsmittel | 20 ml tert-Amylalkohol (Wassergehalt < 0.1 %) |
| Trocknungsmittel | aktiviertes Molsieb |
| Temperatur | 50°C |
| Reaktionsdauer | 24-72 h |

Nach Ablauf der Reaktionszeit wurde das Enzym-Immobilisat über Faltenfilter umgehend abfiltriert und dreimal mit wenig 50°C warmen tert-Amylalkohol gewaschen. Anschließend wurde das Lösungsmittel unter vermindertem Druck am Rotationsverdampfer abgezogen. Nach Wiederaufnahme des Extraktes mit 10 ml Methanol und 10 ml n-Hexan wurde die MeOH-Phase mittels Scheidetrichter abgetrennt, am Rotationsverdampfer abgezogen und gefriergetrocknet. Die n-Hexan-Phase mit den nicht umgesetzten Fettsäuren wurde verworfen.

11. Untersuchung von biologischen Aktivitäten

11.1 Antimikrobielle Aktivitätstests

Testorganismen:

- grampositive Bakterien (*Bacillus megaterium*, *Staphylococcus aureus*)
NB-Agar, 30°C, Dunkelheit, 24 h
- gramnegative Bakterien (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*)
NB-Agar, 30°C, Dunkelheit, 24 h
- Pilze (*Ustilago violacea*, *Ustilago maydis*, *Fusarium oxysporum*, *Eurotium repens*, *Mycotypha microspora*, *Cladosporium cucumerinum*)
MPY-Agar, 27°C, Dunkelheit, 3 - 5 Tage
- Alge (*Chlorella fusca*)
CP-Agar, 20°C, 16 h hell, 8 h dunkel, 5 Tage

11.2 Agardiffusionstest

Mit Hilfe des Agardiffusionstests wurden die Kulturextrakte der bakteriellen Isolate auf antimikrobielle Wirkung getestet. Auf entsprechende Agarplatten wurde jeweils ein steriles Filterplättchen (5 mm Durchmesser) gelegt und mit 10 µl Extrakt (gelöst in Ethylacetat) getränkt. Nach 2 h (Raumtemperatur) wurden die Platten mit der jeweiligen Testorganismensuspension besprüht und entsprechend den Wachstumsbedingungen des Testorganismus inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde der Hemmhofdurchmesser ermittelt.

11.3 DC-Overlaytest

Eine genauere Zuordnung der im Rohextrakt hemmenden Substanzen wurde durch diese Variante des Agardiffusionstests erzielt. Es wurden zwei Dünnschichtchromatogramme des Extraktes angefertigt. Zur Lokalisation der antimikrobiellen Substanzen wurde ein Chromatogramm für 2 h auf eine NB-Agarplatte gelegt. Nach dem Entfernen des Chromatogramms wurde die Platte wie oben beschrieben mit dem jeweiligen Testorganismus besprüht und inkubiert. Durch Vergleich der inkubierten Agarplatte mit dem zweiten Chromatogramm (Detektion vgl. 9.2), konnte eine Zuordnung der wirksamen Substanz erfolgen.

11.4 Bouillon-Dilutionstest

Mit Hilfe dieses Röhrchentests wurde die minimale Hemmkonzentration (MHK) und die Wirkstoffkonzentration bei 50 %iger Wachstumshemmung (IC₅₀-Wert) ermittelt. Die Methode wurde entsprechend dem Bouillon-Dilutionstest DIN 58940 Teil 5 durchgeführt [Normenausschuss Medizin 1989]. Von dem Extrakt wurde eine 1.024 g/l Stammlösung in NB-Medium und DMSO als Lösungsvermittler hergestellt, aus der jeweils 1 ml aller weiteren Verdünnungen hergestellt wurden. Die Reagenzglas-Ansätze wurden mit 1 ml einer 18 (+/- 2) h alten Testorganismuskultur mit einer Animpfdichte von 10⁵ - 10⁶ Keimen pro ml gestartet. Die Inkubation erfolgte bei 30°C, 240 Upm (Schüttelmaschine LabShaker, Braun Melsungen) für 18 h. Als Referenz für

vollständige Wachstumshemmung wurde ein Ansatz mit NB-Medium und Inokulum bei 4°C inkubiert. Die Wirkstoffkonzentration, bei der die Keimzahl des Referenzansatzes erreicht wurde, entspricht dem MHK-Wert. Der IC₅₀-Wert ergab sich aus der Konzentration, bei der die Hälfte der Keimzahl des Ansatzes mit NB-Medium und Inokulum, der bei 30°C inkubiert wurde, erreicht war.

11.5 Externe Aktivitätstests

Alle aus Rohextrakten isolierten Reinsubstanzen wurden für weitere biologische Tests an auswärtige Institute und Firmen abgegeben. Die nachfolgende Tabelle II.4 enthält eine Übersicht.

Tabelle II.4: Aufstellung aller auswärtig durchgeführten biologischen Tests.

| Art des Tests | Ausführende Stelle | Prinzip |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Zytotoxizitätstests gegenüber Tumorzellen L 5178Y | Institut für Physiologische Chemie, Universität Mainz | MTT-Aktivitätstest |
| Zytotoxizitätstests gegenüber Tumorzellen HM02 (Magencarcinom) | Prof. Dr. Beil, Institut für Allgemeine Pharmakologie, MH Hannover | Hemmung des Zellwachstums im Mikrotiterstest |
| Zytotoxizitätstests gegenüber Tumorzellen HEP-G2 (Lebercarcinom) | Prof. Dr. Beil, Institut für Allgemeine Pharmakologie, MH Hannover | Hemmung des Zellwachstums im Mikrotiterstest |
| Neuroprotektionstest | Fa. Merz + Co. GmbH & Co. Frankfurt | MK-801-Bindungstest |
| Anti-Tumor-Promoting-Test | Dr. Tokuda, Kyoto Prefectural University of Medicine, Japan | Inhibierung der durch TPA induzierten Aktivierung des EBV-EA |
| Protein Kinase-Test | KTB Tumorforschung GmbH, Freiburg | Hemmung und Aktivierung von 11 Protein Kinasen im Mikrotiterstest |

III Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit werden in drei Teile unterteilt:

- Isolierung der aus dem Schwamm *Acanthella acuta* gewonnenen Bakterienisolate und Screening nach Naturstoffbildung
- Optimierung der Kultivierungsparameter und der Medienzusammensetzung bezüglich des Wachstums und der Produktbildung der aus dem Schwamm *Acanthella acuta* gewonnenen Eigenisolate *Bacillus subtilis* (16S rRNA Gensequenzierung: 97 % Ähnlichkeit aufgrund eines Datenbankvergleichs mit DSM 347) und *Psychroflexus* spec. (90 %)
- Charakterisierung der gewonnenen Reinsubstanz aus *Bacillus subtilis* und der daraus durch biokatalytische Modifikation neu synthetisierten Verbindungen: Strukturaufklärung mittels spektroskopischer Daten, biologische Aktivität in verschiedenen Testsystemen und physiko-chemische Eigenschaften

1. Screening nach Bakterien aus *Acanthella acuta*

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Screening nach Mikroorganismen durchgeführt, die in der Lage sind, niedermolekulare Naturstoffe zu produzieren. Diesbezüglich wurden ausschließlich Mikroorganismen aus dem marinen Schwamm *Acanthella acuta* isoliert und kultiviert.

1.1 Isolierung und Anreicherung der Mikroorganismen

Für die Isolierung der Mikroorganismen wurden von Herrn Dr. W. Schatton (Firma KliniPharm, Frankfurt) eine Schwammprobe aus der Ägäis vor der Küste Kretas (Litoral) zur Verfügung gestellt. Dabei handelte es sich um den Schwamm *Acanthella*

acuta. Die Probe wurde wie in Abschnitt II.3 beschrieben behandelt. Nach Vereinzelung der Mikroorganismen wurden diese zur Anreicherung mehrere Tage im Brutraum inkubiert. Die Charakterisierung der Einzelisolate erfolgte nach morphologischen und physiologischen Gesichtspunkten. Die Tabelle III.1 gibt eine Übersicht über die erhaltenen Reinkulturen.

Tabelle III.1: Morphologische und physiologische Eigenschaften der Bakterienisolate aus der Schwamm- (AAS) bzw. Wasserprobe (AAW) von *Acanthella acuta*.

| Isolat | Wachstum [d] | Farbe | Form | Gram- Verhalten | Oxidase- Test |
|--------|-----------------|--------------|----------------------------|--------------------|------------------|
| AAS1 | 1 | beige | Stäbchen | + | + |
| AAS2 | 1 | beige | Stäbchen | - | + |
| AAS3 | 1 | beige | Stäbchen | + | - |
| AAS4 | 2 | gelb | Kokken | + | - |
| AAS5 | 2 | orange | Kokken | + | - |
| AAS6 | 2 | orange | Stäbchen (dünne Nadeln) | - | - |
| AAS7 | 2 | beige | Kokken | + | + |
| AAS8 | 3 | gelb | Stäbchen | - | - |
| AAS9 | 3 | gelb | Stäbchen | - | - |
| AAS10 | 4 | orange | Stäbchen | + | - |
| AAS11 | 5 | braun | Stäbchen | - | - |
| AAS12 | 7 | rot | Stäbchen (lange Fäden) | - | + |
| AAW1 | 1 | beige | Stäbchen | - | - |
| AAW2 | 1 | beige | Stäbchen | - | - |
| AAW3 | 2 | braun-orange | Kokken | - | + |
| AAW4 | 3 | gelb | Stäbchen | - | - |

Durch Kultivierung auf Marine Broth konnten aus der Schwammprobe 12 und aus der Meerwasserprobe (Umgebungswasser des Schwammes) 4 verschiedene Bakterienisolate erhalten werden. Bei 58 % der Bakterien handelte es sich um gramnegative und bei 42 % um grampositive Stämme. Die vorherrschende Wachstumsform war mit 75 % die Stäbchenform im Vergleich zur Kugelform mit 25 %. Die höchste Kolonienbildung konnte in den ersten zwei Tagen beobachtet werden (62.5 %). Mit Zunahme der Inkubationszeit verlangsamte sich die Kolonienbildung. Das letzte Bakterium trat nach 7 Tagen auf.

Mit Hilfe der BBL-Identifizierungssysteme gelang keine eindeutige Zuordnung der Bakterienisolate in bestimmte Gattungen. Einzelne Stämme konnten jedoch einer Gruppe von näher verwandten Bakterien zugeordnet werden (Tabelle III.2).

Tabelle III.2: Zuordnung einiger Eigenisolate mit Hilfe von BBL-Identifizierungssystemen.

| Isolat | Gruppe der möglichen Bakterienstämme |
|-------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| AAS1 | <i>Vibrio alginolyticus</i> <i>Aeromonas hydrophila</i> |
| AAS2, AAW1 | <i>Pasteurella multocoda</i> <i>Moxarella spec.</i> <i>Pseudomonas spec.</i> |
| AAS6, AAS11, AAW3, AAW4 | <i>Acinetobacter lwoffii</i> <i>Pseudomonas maltophilia</i> |

2. Biologisches und chemisches Screening

Alle 16 Bakterienisolate aus *Acanthella acuta* bzw. aus dem Umgebungswasser wurden auf antimikrobielle Aktivität überprüft.

2.1 Agardiffusionstest

Alle Reinkulturen wurden im Schüttelkolbenmaßstab auf Marine Broth kultiviert. Nach Erreichen der stationären Phase wurden die Zellen und die Kulturüberstände getrennt voneinander aufgearbeitet und die erhaltenen Rohextrakte im

Agardiffusionstest eingesetzt. Die Rohextraktmenge pro Filterplättchen betrug jeweils 250 µg gelöst in 10 µl Ethylacetat. Die positiven Testergebnisse werden in Tabelle III.3 gezeigt.

Tabelle III.3: Hemmwirkung der Rohextrakte aus den Eigenisolaten auf verschiedene Testorganismen im Agardiffusionstest.

| Rohextrakt | Testorganismus | Hemmwirkung Durchmesser [mm] |
|--------------------|----------------------------|---------------------------------|
| AAS3 Überstand | <i>Bacillus megaterium</i> | 22 |
| AAS5 Überstand | <i>Bacillus megaterium</i> | 20 |
| | <i>Chlorella fusca</i> | 20 |
| AAS8 Überstand | <i>Bacillus megaterium</i> | 13 |
| | <i>Ustilago violacea</i> | 10 |
| | <i>Chlorella fusca</i> | 12 |
| AAS8 Zellen | <i>Bacillus megaterium</i> | 10 |
| AAS12 Überstand | <i>Bacillus megaterium</i> | 9 |
| | <i>Escherichia coli</i> | 11 |
| AAS12 Zellen | <i>Bacillus megaterium</i> | 15 |
| AAW2 Überstand | <i>Bacillus megaterium</i> | 12 |
| | <i>Chlorella fusca</i> | 10 |

Insgesamt zeigten Extrakte aus 5 von 16 Stämmen Hemmwirkungen gegenüber den verwendeten Testorganismen. Dabei überwogen die Hemmwirkungen der Kulturüberstandextrakte im Vergleich zu den Zellrohextrakten (5 bzw. 2).

Am meisten gehemmt wurde das Bakterium *Bacillus megaterium* und die Alge *Chlorella fusca*. Die Pilze *Eurotium repens*, *Fusarium oxysporum*, *Cladosporium cucumerinum* und *Mycotypha microspora* wurden durch keines der 16 Isolate gehemmt. Die größten Hemmwirkungen erzielten die Überstandsextrakte der Stämme AAS3 und AAS5 (20 bzw. 22 mm).

2.2 Chemisches Screening

Zusätzlich zu den antimikrobiellen Tests wurden die Rohextrakte aus Zellen und Kulturüberständen dünnenschichtchromatographisch untersucht. Die entwickelten Karten wurden mit den unter II.9.2 aufgeführten Sprühreagenzien angefärbt und auf ungewöhnliche und auffällige Banden geprüft. Die positiven Ergebnisse sind in Tabelle III.4 zusammengefasst.

Tabelle III.4: Qualitative Untersuchung der Rohextrakte mittels Dünnschichtchromatographie.

| Rohextrakt | Sprühreagenz | Bereich |
|-------------------|------------------------------------------------------------------|----------------|
| AAS3 Zellen | α -Naphthol Methanol-Schwefelsäure | polar polar |
| AAS8 Überstand | 2',7'-Dichlorfluorescein-Aluminiumchlorid- Eisen(III)-chlorid | unpolar |
| | Anisaldehyd-Schwefelsäure | unpolar |
| AAS12 Zellen | rotes Pigment (ohne) | unpolar |
| AAS12 Zellen | 2',7'-Dichlorfluorescein-Aluminiumchlorid- Eisen(III)-chlorid | unpolar |
| | Anisaldehyd-Schwefelsäure | unpolar |

In Tabelle III.4 sind lediglich die außergewöhnlichen Banden aufgeführt. Eine Reihe von Flecken fanden sich in mehreren Rohextrakten wieder und wurden daher als häufig vorkommende Metabolite und demzufolge als uninteressant für das chemische Screening angenommen.

2.3 DC-Overlaytest

Mit den Rohextrakten aller 5 im Agardiffusionstest positiv getesteten Stämme wurde ein DC-Overlaytest mit den Testorganismen *Bacillus megaterium* und *Escherichia coli* durchgeführt. Trotz eindeutiger Hemmwirkungen im Agardiffusionstest zeigten nur die Rohextrakte der Bakterien AAS8 (Kulturüberstand) und AAS12 (Zellextrakt) eine deutliche Hemmzone von *Bacillus megaterium* im unpolaren Bereich. Diese Hemmzonen waren mit den im chemischen Screening auffälligen Banden identisch.

Da dieser Bereich dem Fettsäurebereich entspricht und zahlreiche Fettsäuren für ihre antimikrobielle Wirkung bekannt sind [Hüners, 1999], wurde auf die Identifizierung dieser Banden verzichtet.

Zusammenfassung

Aus dem Schwamm *Acanthella acuta* konnten 16 verschiedene Eigenisolate erhalten werden. Bei der Mehrzahl der Isolate handelte es sich um gramnegative Bakterien (58 %). 5 Stämme zeigten antimikrobielle Wirkungen. Die größte Hemmwirkung konnte bei den Bakterienisolaten AAS3 und AAS5 (20 bzw. 22 mm, Agar-diffusionstest) beobachtet werden. Im DC-Overlaytest und im chemischen Screening konnte gezeigt werden, dass die Hemmwirkungen im unpolaren Bereich auf Fettsäuren zurückzuführen waren (Sprühreagenz Dichlorfluorescein). Im chemischen Screening zeigten die Eigenisolate AAS3 (Zellextrakt; zuckerpositiv) und AAS12 (Kulturüberstand; rotes Pigment) auffällige Banden. Daher wurden die Bakterien AAS3 und AAS12 ausgewählt, um Wirkstoffbildung und Wachstum zu untersuchen.

3. Das Bakterienisolat AAS12

Bei dem isolierten Bakterium handelt es sich um ein rotes, langes, unbewegliches, gramnegatives Stäbchen, mit einer Länge von 1.5 - 3.5 µm und einer Breite von 0.5 - 0.6 µm. Der Stamm ist hinsichtlich der 16S rDNA Sequenzierung und des Fettsäureprofiles (Tabelle III.5) dem Komplex *Flavobacterium/Cytophaga/Flexibacter* zuzuordnen (DSMZ, Braunschweig). Die maximale Ähnlichkeit zur Gattung *Cytophaga* beträgt jedoch nur 85 %. Auch das Fehlen von Flexirubin und gleitender Beweglichkeit schließen die Gattung *Cytophaga* aus. Die höchste Ähnlichkeit mittels 16S rDNA Sequenzanalyse beträgt 90 % zu der neu beschriebenen Gattung *Psychroflexus*. Daher ist Stamm AAS12 Vertreter einer neuen Spezies: *Psychroflexus* spec. nov.

Tabelle III.5: Zelluläres Fettsäureprofil von AAS12.

| Fettsäure | Anteil (%) |
|------------------|------------|
| C 14:1 iso E | 0.58 |
| Unbekannt 13.568 | 1.94 |
| C 15:0 iso | 39.21 |
| C 15:0 anteiso | 4.21 |
| C 15:1 ω6c | 1.30 |
| C 15:0 | 5.77 |
| C 16:0 iso H | 0.83 |
| C 16:0 | 8.50 |
| C 15:0 iso 3OH | 6.08 |
| C 15:0 2OH | 0.69 |
| C 17:1 ω9c iso | 7.76 |
| C 17:1 ω8c | 0.42 |
| C 17:1 ω6c | 1.43 |
| C 16:0 iso 3OH | 1.91 |
| C 18:1 ω5c | 2.84 |
| C 17:0 iso 3OH | 11.75 |
| C 17:0 2OH | 0.83 |

3.1 Das Wachstumsverhalten von *Psychroflexus spec.*

Das Wachstum von *Psychroflexus spec.* in MB-Medium verläuft im Schüttelkolben wie in Abbildung III.1 dargestellt.

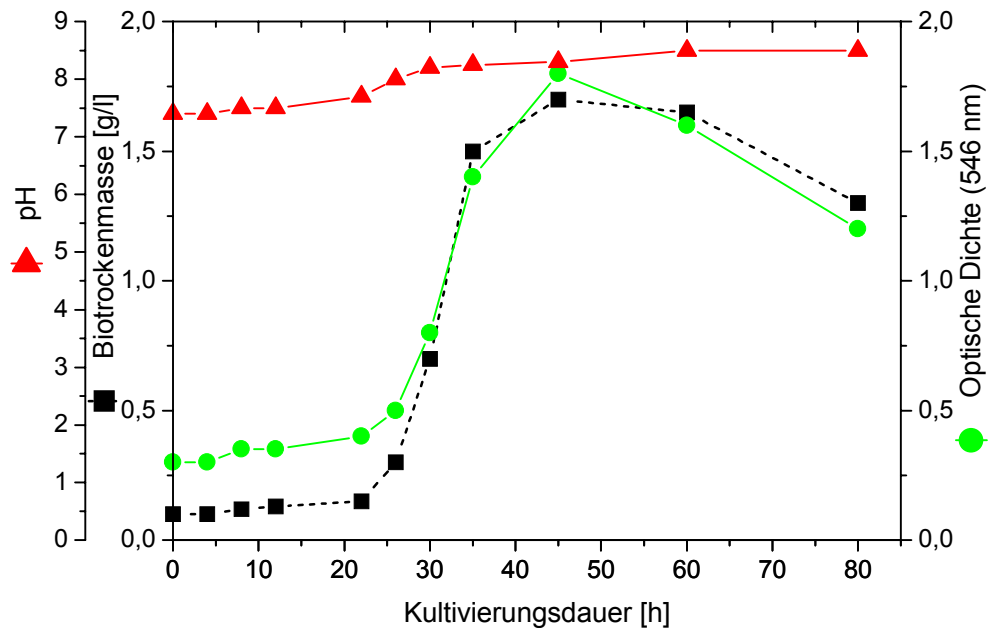


Abbildung III.1: Wachstumsverhalten von *Psychroflexus spec.* im Schüttelkolben. Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; Marine Broth; 27°C; 100 Upm.

Nach einer langen Lag-Phase von 22 h erreichte der Organismus die exponentielle Phase. Nach 45 h wurde eine maximale BTM von 1.7 g/l bzw. eine maximale optische Dichte von 1.8 erreicht. Da *Psychroflexus spec.* einen roten Farbstoff bildete, wird im weiteren Verlauf die optische Dichte nicht weiter berücksichtigt. Die aus dem Verlauf der BTM berechnete maximale Wachstumsrate betrug nach 35 h 0.18 1/h. Gleichzeitig war das exponentielle Wachstum mit einem Anstieg des pH-Wertes von 7.4 auf 8.3 verbunden. Nach 45 h setzte die Absterbephase ein. Die BTM verringerte sich bis zum Abbruch der Kultivierung nach 80 h auf 1.3 g/l.

3.2 Mediumsoptimierung für *Psychroflexus spec.*

Da es sich bei dem Bakterium *Psychroflexus spec.* um eine neue Art handelte, wurden im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe von BBL®-Testsystemen die Verwertbarkeit von folgenden C-Substraten durch *Psychroflexus spec.* überprüft (48 h Inkubation):

| | |
|------------|---|
| Glucose | - |
| Glycerin | - |
| Arabinose | - |
| Saccharose | - |
| Lactose | - |
| Trehalose | - |
| Fructose | - |
| Malat | - |
| Mannose | - |
| Citrat | - |

Keine der getesteten C-Substrate wurde durch *Psychroflexus spec.* verwertet. Daraufhin wurden verschiedene Konzentrationen der komplexen Bestandteile Hefeextrakt bzw. Pepton auf Wachstumssteigerung untersucht. Die Ergebnisse werden in Abb. III.2 gezeigt. Bei Zugabe von 10 g/l Hefeextrakt zum MB-Medium wurde das maximale Wachstum bei einer BTM von 2.4 g/l erreicht. Dies entsprach einer Zunahme von 41 % im Vergleich zum maximalen Wachstum auf MB ohne Substratzusatz. Durch die Zugabe von Pepton wurde das Wachstum ebenfalls verbessert, aber die dabei erreichten Biotrockenmassen ($BTM_{\max} = 2.0 \text{ g/l}$ bei 10 g/l) lagen deutlich niedriger als beim Zusatz von Hefeextrakt.

Da im MB-Medium eine Kombination von Hefeextrakt und Pepton vorliegt und vorangegangene Untersuchungen bestätigten, dass das Wachstum von beiden Substraten abhängt, wurde die optimale Kombination aus beiden ermittelt. Hierfür wurden Versuche mit Marine Broth unter Zugabe von 10 g/l Hefeextrakt mit verschiedenen Peptonkonzentrationen durchgeführt (Abb. III.3). Durch Zugabe von 3 g/l Pepton konnte eine maximale BTM von 2.9 g/l erreicht werden. Höhere Peptonkonzentrationen wirkten wachstumsinhibierend.

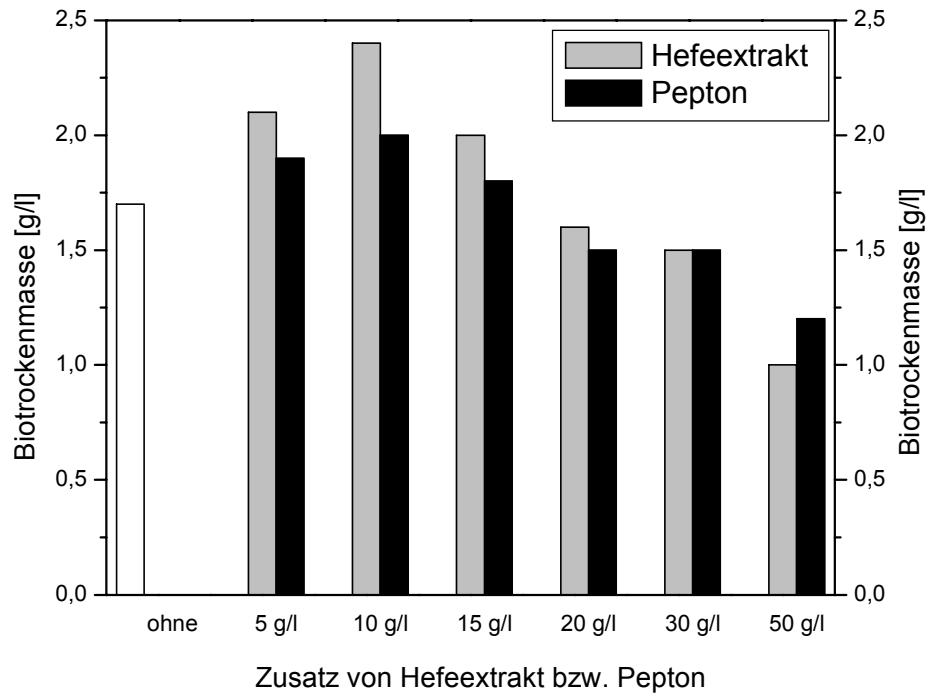


Abbildung III.2: Biotrockenmassenbildung von *Psychroflexus spec.* in Abhängigkeit des Zusatzes von Hefeextrakt bzw. Pepton. Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; MB; 27°C; 100 Upm; 48 - 72 h.

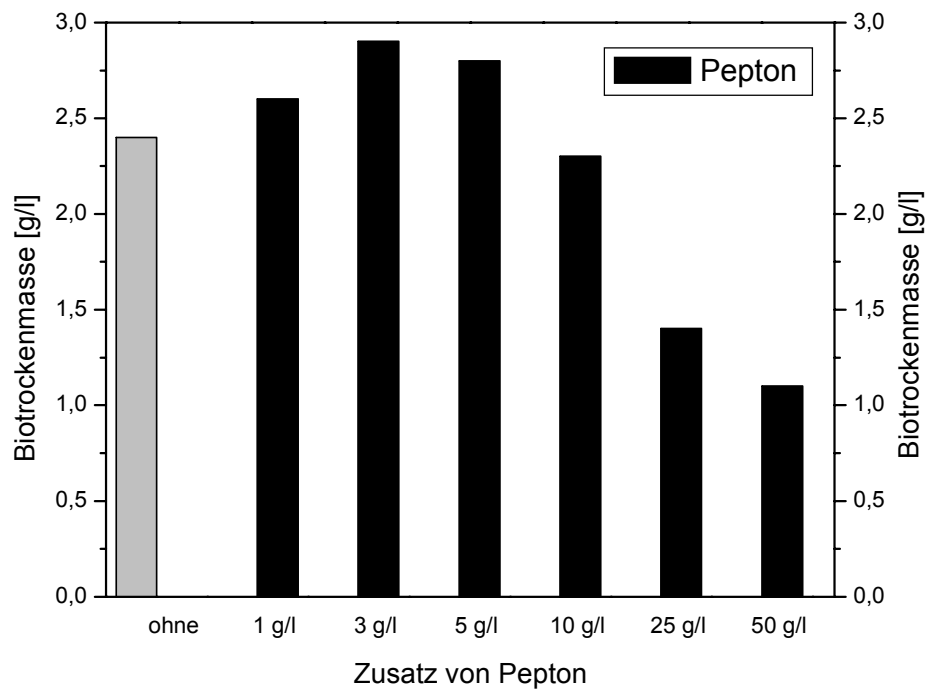


Abbildung III.3: Biotrockenmassenbildung von *Psychroflexus spec.* in Abhängigkeit des Zusatzes von Pepton. Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; MB + 10 g/l Hefeextrakt; 27°C; 100 Upm; 48 - 72 h.

3.3 Einfluss der Inkubationstemperatur

Im folgenden wurde für das neue Bakterium *Psychroflexus spec.* die optimale Wachstumstemperatur ermittelt. Unter Verwendung des optimierten Mediums wurde das Wachstum für einen Temperaturbereich von 4°C bis 37°C untersucht. Aus Abb. III.4 geht hervor, dass es sich bei *Psychroflexus spec.* um ein psychrotolerantes Bakterium handelt, dessen Temperaturoptimum bei 23°C liegt. Bis 4°C war immer noch Wachstum nachzuweisen, jedoch stark verlangsamt (120 h). Die maximale Biomassenkonzentration von 3.2 g/l wurde bei 23°C erreicht. Weiterer Temperaturanstieg führte ebenfalls zu einer Verlangsamung des Wachstums.

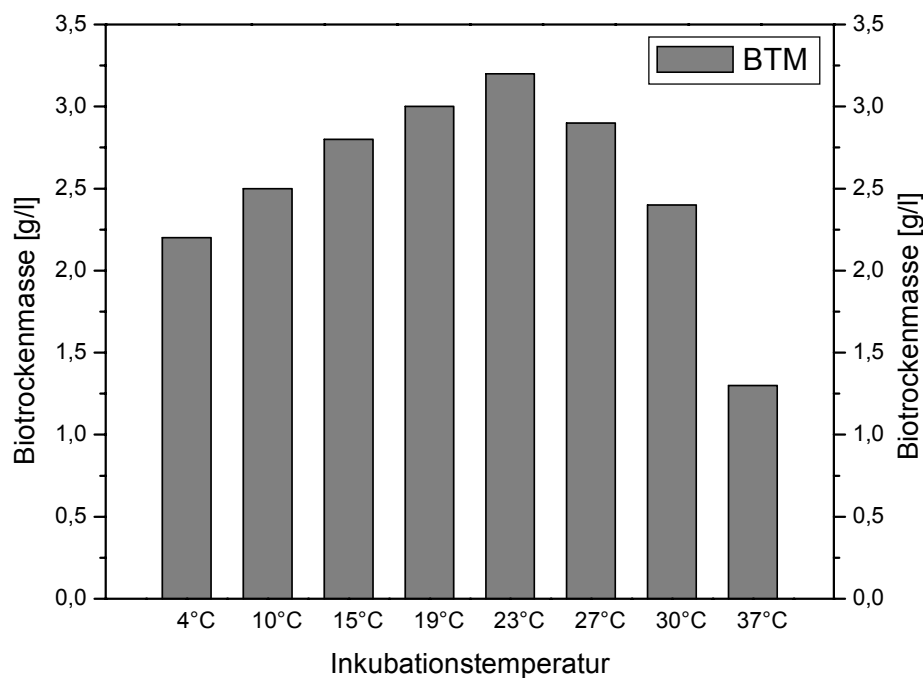


Abbildung III.4: Temperaturabhängigkeit des Wachstums von *Psychroflexus spec.*
Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; MB + 10 g/l Hefeextrakt + 3 g/l; 100 Upm;
24 - 120 h.

3.4 Bioreaktorkultivierung von *Psychroflexus spec.*

In den vorausgegangenen Untersuchungen konnten die optimalen Wachstumsbedingungen für *Psychroflexus spec.* ermittelt werden. Die gewonnenen Erkenntnisse sollten nun auf eine Bioreaktorkultivierung angewendet werden, um eine für die Strukturaufklärung des roten Farbstoffes ausreichende Menge an Rohextrakt produzieren zu können. Die Wahl der Rührerdrehzahl und der Belüftungsrate entsprach den Erfahrungswerten vorhergehender Kultivierungen. Abbildung III.5 gibt eine Zusammenfassung des Kultivierungsverlaufs im 50 l Bioreaktor.

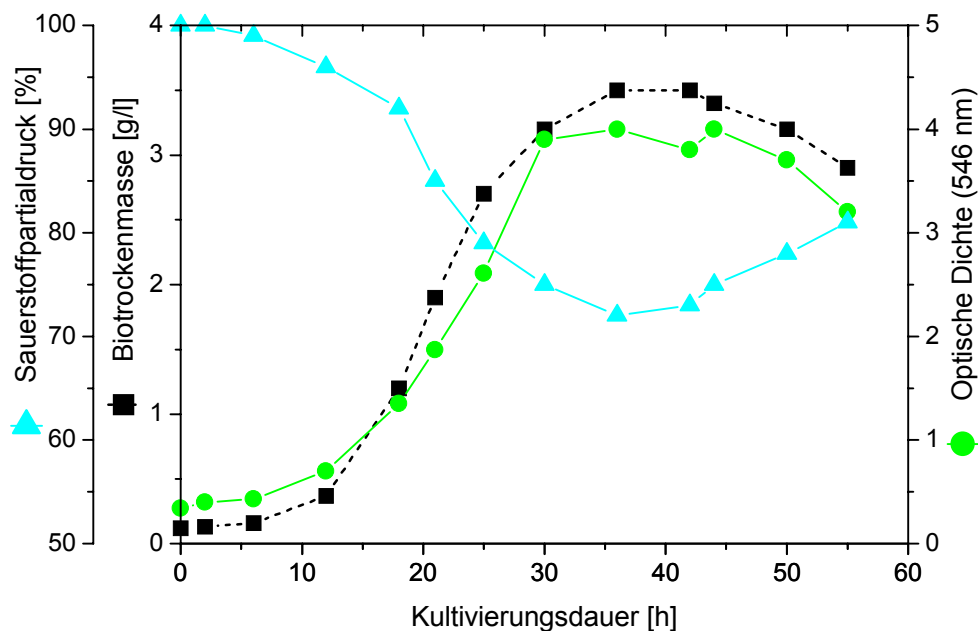


Abbildung III.5: Batch-Kultivierung von *Psychroflexus spec.* im Bioreaktor.
Bedingungen: 50 l Bioreaktor; 40 l Marine Broth + 10 g/l Hefeextrakt + 3 g/l Pepton;
23°C; pH 7.5; 250 Upm; 0.3 v/vm; 5 % Inokulum.

Die Biomassenkonzentration stieg bis zu einer Kultivierungsdauer von 36 h auf einen Wert von 3.5 g/l und die maximale Wachstumsrate wurde bei 18 h mit 0.20 1/h erreicht. Anschließend blieb die BTM bis zur 42. Stunde konstant, um dann in der Absterbephase auf 2.9 g/l (55 h) abzusinken. Einen entsprechend entgegengesetzten Verlauf weist der Sauerstoffpartialdruck auf. Das Minimum mit 72 % wurde nach 35 h festgestellt.

3.5 Charakterisierung des Farbstoffes aus *Psychroflexus spec.*

1.21 g Zellextrakt (Extraktion der Zellen mit CHCl_3), gewonnen aus 40 l Kulturbrühe der Bioreaktorkultivierung (Kapitel 3.4), wurden auf einer NP-Kieselgelsäule aufgetragen und mit dem Lösungsmittelgemisch $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95/5) (v/v) eluiert. Eine der erhaltenen Fraktionen wurde über präparative Schichtchromatographie weiter in ihre einzelnen Bestandteile aufgetrennt. In Tabelle III.6 sind die Ausbeuten, die daraus berechneten Konzentrationen in der Kulturbrühe sowie die R_F -Werte auf NP-Kieselgel im Laufmittelsystem $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/15/2) (v/v/v) angegeben. Aus 1.21 g Zellextrakt konnten 3 mg (0.075 mg/l) des roten Pigmentes PFP2 gewonnen werden.

Tabelle III.6: Ausbeute der im Zellextrakt von *Psychroflexus spec.* erhaltenen Pigmente.

| | Ausbeute [mg] | R_F -Wert |
|------------------------|---------------|-------------|
| Zellrohextrakt | 1210 | |
| Fraktion B | 36 | 0.7-0.9 |
| Aus Fraktion B: | | |
| PFP1 | < 1 | 0.87 |
| PFP2 | 3 | 0.79 |
| PFP3 | < 1 | 0.72 |

Bei dem Pigment PFP2 handelte es sich um einen orange-roten Farbstoff. Die Auswertung der spektroskopischen Daten ergab das Carotenoid Caloxanthin. ^1H -NMR, EI-MS, CI-MS, UV-Spektrum und das ^{13}C -NMR lassen die Verbindung eindeutig als Caloxanthin bestimmen. EI- und CI-MS zeigen eine Masse von 585 Dalton an. Das ^{13}C -NMR verweist auf 4 Methylgruppen bei 13 ppm, sowie weitere Methylgruppen zwischen 20 und 30 ppm. Weiterhin erkennt man drei Methylengruppen bei 37, 43 und 48 ppm und eine Methingruppe bei 65 ppm - des weiteren Methingruppen bei tieferem Feld, den Doppelbindungen zugeordnet. Die Struktur ist in Abbildung III.6 dargestellt. Eine vollständige Charakterisierung der

Pigmente PFP1 und PFP3 war aufgrund der geringen Ausbeute von weniger als 1 mg nicht möglich. Anhand einiger Strukturmerkmale konnten sie jedoch ebenfalls der Gruppe der Carotenoide zugeordnet werden.

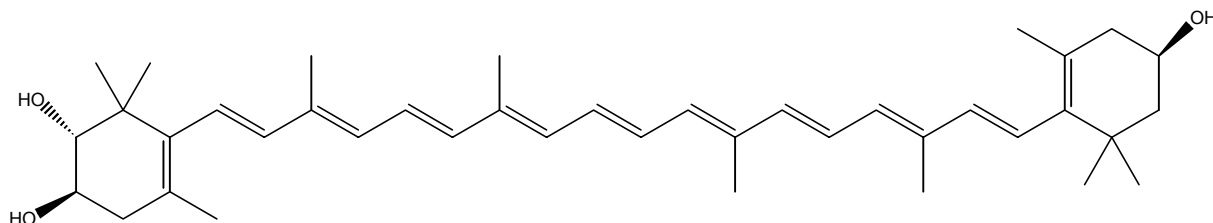


Abbildung III.6: Struktur des Caloxanthin (PFP2) aus *Psychroflexus spec.*

Zusammenfassung

Bei dem Eigenisolat AAS12 handelt es sich um eine neue Species der Gattung *Psychroflexus*, *Psychroflexus spec. nov.* (16S rDNA Sequenzanalyse, DSMZ, Braunschweig). Der direkte Vergleich der Ausgangskultivierung im Schüttelkolben mit der optimierten Batch-Kultivierung im Bioreaktor ist in Tabelle III.7 dargestellt.

Tabelle III.7: Vergleich der Kultivierungen (Schüttelkolben bzw. Bioreaktor) von *Psychroflexus spec.*

| Parameter | Schüttelkolben | Bioreaktor (optimiert) |
|---------------------------|----------------------------|-------------------------------------------|
| Kultivierungsdauer | 45 h [BTM _{max}] | 36 h [BTM _{max}] |
| BTM_{max} | 1.7 g/l | 3.5 g/l |
| μ_{max} | 0.18 1/h | 0.20 1/h |
| Temperatur | 27°C | 23°C |
| Medium | MB | MB + 10 g/l Hefeextrakt + 3 g/l Pepton |

Aus *Psychroflexus spec. nov.* konnte der orange-rote Farbstoff Caloxanthin (Abbildung III.6) in einer Konzentration von 0.075 mg/l isoliert werden.

4. Das Bakterienisolat AAS3

Das isolierte Bakterium ist hinsichtlich der 16S rDNA Sequenzierung (I. Wagner-Döbler, GBF, Braunschweig) der Art *Bacillus subtilis* zuzuordnen. Die maximale Ähnlichkeit beträgt 97 %. Dieses Eigenisolat zeigte im chemischen Screening eine auffällige polare Bande (zuckerpositiv). Da in diesem Bereich die Substanzklasse der Glycoglycerolipide ähnliche Banden zeigen und diese Verbindungen für ihre bioaktiven Eigenschaften bekannt sind [Wicke, 1999], wurde dieses Isolat genauer untersucht.

4.1 Das Wachstumsverhalten des marinen *Bacillus subtilis* auf Marine Broth

Das Wachstum von *Bacillus subtilis* in MB-Medium verläuft im Schüttelkolben wie in Abbildung III.7 dargestellt.

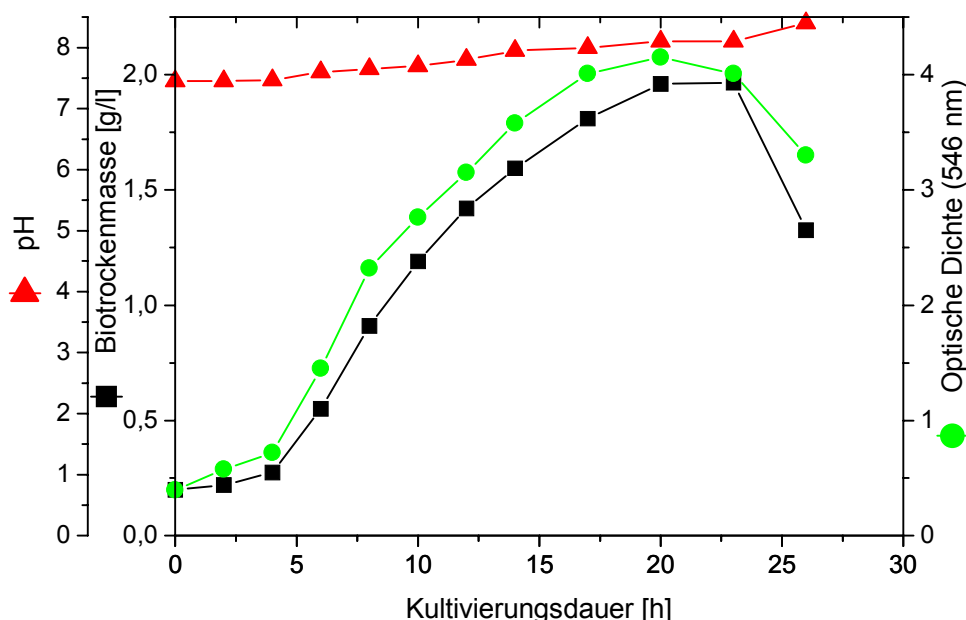


Abbildung III.7: Wachstumsverhalten von *Bacillus subtilis* im Schüttelkolben. Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; Marine Broth; 27°C; 100 Upm.

Nach einer Lag-Phase von 5 h erreichte *Bacillus subtilis* die exponentielle Phase. Dabei wurde nach 20 h eine maximale BTM von 2.0 g/l bzw. eine maximale optische Dichte von 4.0 erreicht. Die aus dem Verlauf der BTM berechnete maximale Wachstumsrate betrug nach 6 h 0.34 1/h. Gleichzeitig war das exponentielle Wachstum mit einem Anstieg des pH-Wertes von 7.4 auf 8.0 verbunden. Nach 22 h setzte die Absterbephase ein. Die BTM verringerte sich bis zum Abbruch der Kultivierung nach 26 h auf 1.3 g/l.

4.2 Optimierung des Wachstums durch zusätzliche C-Substrate

Um eine geeignete zusätzliche Kohlenstoff- und Energiequelle für optimales Wachstum zu finden, wurden 50 % MB-Medium verschiedene C-Substrate in einer Konzentration von 0.5 % zugesetzt. Die Vorkultur wurde auf reinem MB-Medium angesetzt. In Tabelle III.8 ist eine Übersicht der BTM der verschiedenen Ansätze aufgeführt.

Tabelle III.8: Einfluss verschiedener zusätzlicher C-Substrate auf Wachstum und Produktbildung (GGL11) von *Bacillus subtilis*.
Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; 50 % MB; 27°C; 100 Upm; 24 - 48 h.

| Ansatz | BTM _{max} [g/l] | GGL11 |
|------------------|--------------------------|-------|
| 5 g/l Glucose | 3.18 | +++ |
| 5 g/l Saccharose | 2.15 | ++ |
| 5 g/l Fructose | 1.55 | ++ |
| 5 g/l Stärke | 1.50 | ++ |
| 5 ml Glycerin | 1.45 | ++ |
| 5 g/l Lactose | 1.21 | ++ |
| 50 % MB | 1.05 | ++ |
| 5 g/l Xylose | 0.91 | + |
| 5 g/l Mannitol | 0.85 | + |
| 5 g/l Sorbose | 0.81 | + |
| 5 g/l Ribose | 0.75 | + |

+++ stark, ++ mittel, + schwach

Die maximale Biotrockenmasse wurde mit 3.18 g/l durch die Zugabe von 0.5 % Glucose erreicht. Dies entspricht einer Verdreifachung der BTM im Vergleich zu 50 % Marine Broth. Gleichzeitig konnte bei dem Substrat Glucose auch die stärkste Glycoglycerolipidbildung (GGL11) beobachtet werden. Die Substrate Saccharose, Fructose, Stärke, Glycerin und Lactose führten ebenfalls zu einer Zunahme der Biotrockenmasse (zwischen 1.21 und 2.15 g/l). Dagegen zeigten die Substrate Xylose, Mannitol, Sorbose und Ribose einen wachstumsinhibierenden Effekt auf die Zellen (BTM < 1 g/l). Glucose wurde als die geeignete zusätzliche Kohlenstoffquelle für weitere Untersuchungen ausgewählt.

4.3 Bioreaktorkultivierung des marinen *Bacillus subtilis*

Basierend auf den vorangegangenen Ergebnissen wurde eine Kultivierung von *Bacillus subtilis* im 50 l Bioreaktor durchgeführt. Ziel dieser Kultivierung war die ausreichende Produktion an Rohextrakt, um die Strukturaufklärung des Glycoglycerolipids GGL11 zu ermöglichen. Die Abbildungen III.8 und III.9 geben eine Zusammenfassung des Kultivierungsverlaufs im 50 l Bioreaktor. Die Wahl des Mediums, der Rührerdrehzahl und der Belüftungsrate entsprach den Erfahrungswerten vorhergehender Kultivierungen. Biotrockenmasse und Proteingehalt der Zellen zeigten einen parallelen Wachstumsverlauf. Die Kultivierung befand sich zwischen der 2. und 7. Stunde in der exponentiellen Wachstumsphase. Nach 13 h wurde eine maximale Biotrockenmasse von 7.4 g/l bzw. eine maximale Proteinkonzentration von 3.4 g/l erreicht.

Der Sauerstoffpartialdruck fiel während der exponentiellen Phase bis auf 40 % (13 h), um dann bis zum Ende der Kultivierung auf 55 % anzusteigen. Die spezifische Wachstumsrate μ erreichte nach 7 h bezogen auf die Biotrockenmasse einen Wert von 0.46 1/h. Die Konzentration an Glucose nahm entgegengesetzt zum Verlauf der BTM ab und war nach 16 h vollständig aufgebraucht. Der zeitliche Verlauf der Produktbildung zeigt eine wachstumsgekoppelte Glycoglycerolipidproduktion. Der maximale Wert an GGL11 mit 30 mg/l wurde nach 13 h erreicht. Im weiteren Verlauf nahm die Konzentration an GGL11 stetig ab.

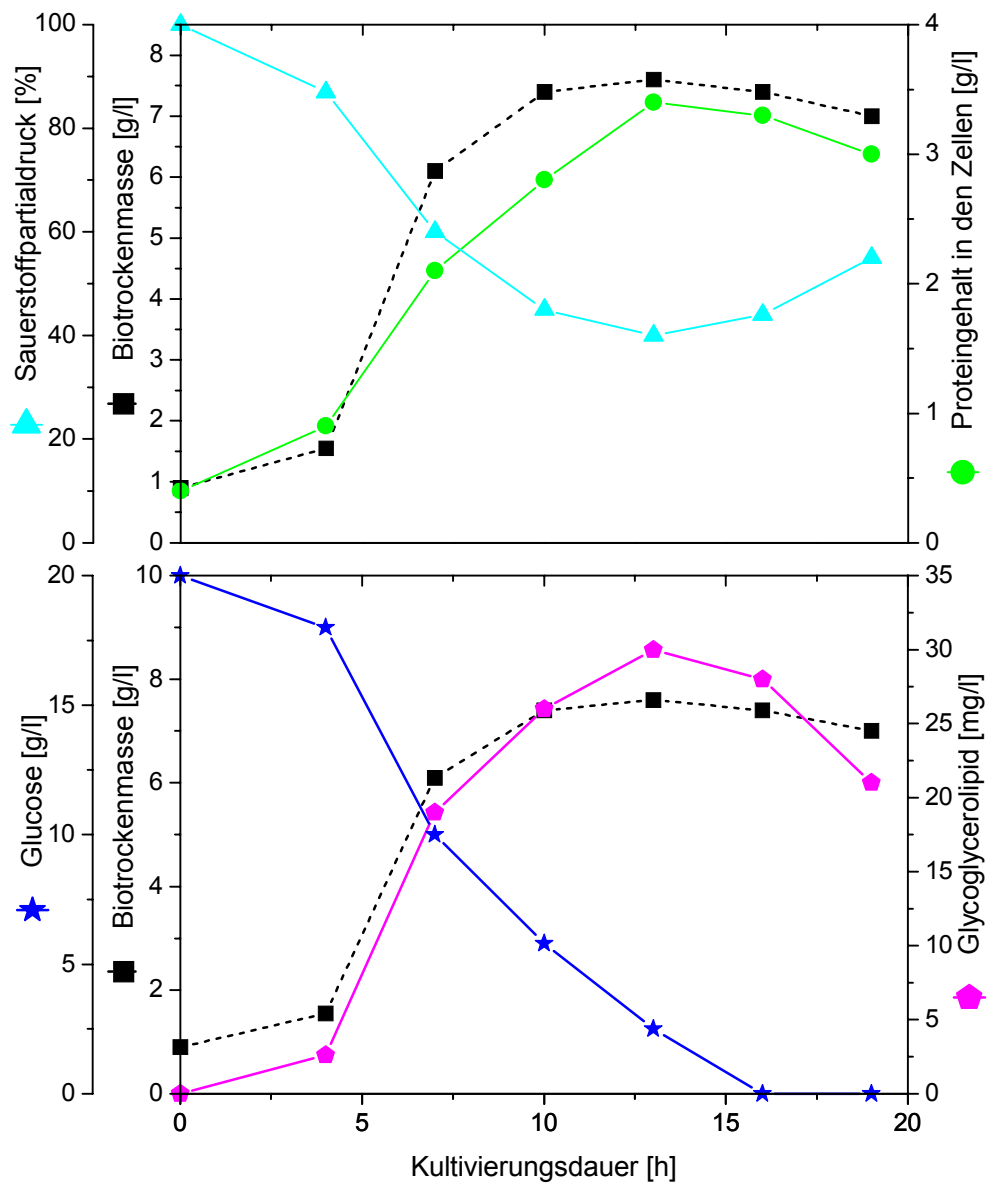


Abbildung III.8: Batch-Kultivierung von *Bacillus subtilis* im Bioreaktor.
Bedingungen: 50 l Bioreaktor; 40 l Marine Broth + 20 g/l Glucose; 27°C;
5 % Inokulum; pH 7.5; 500 Upm; 0.4 v/vm.

Die Sauerstoffaufnahme- und die Kohlendioxidbildungsrate unterstreichen den beschriebenen Wachstumsverlauf der Batch-Kultivierung. Während der Phase des maximalen Wachstums von der 4. bis zur 7. Stunde war auch der Anstieg der Produktbildung am größten. Die Maxima der Sauerstoffaufnahme- und der Kohlendioxidbildungsrate wurden nach ca. 10 h erreicht.

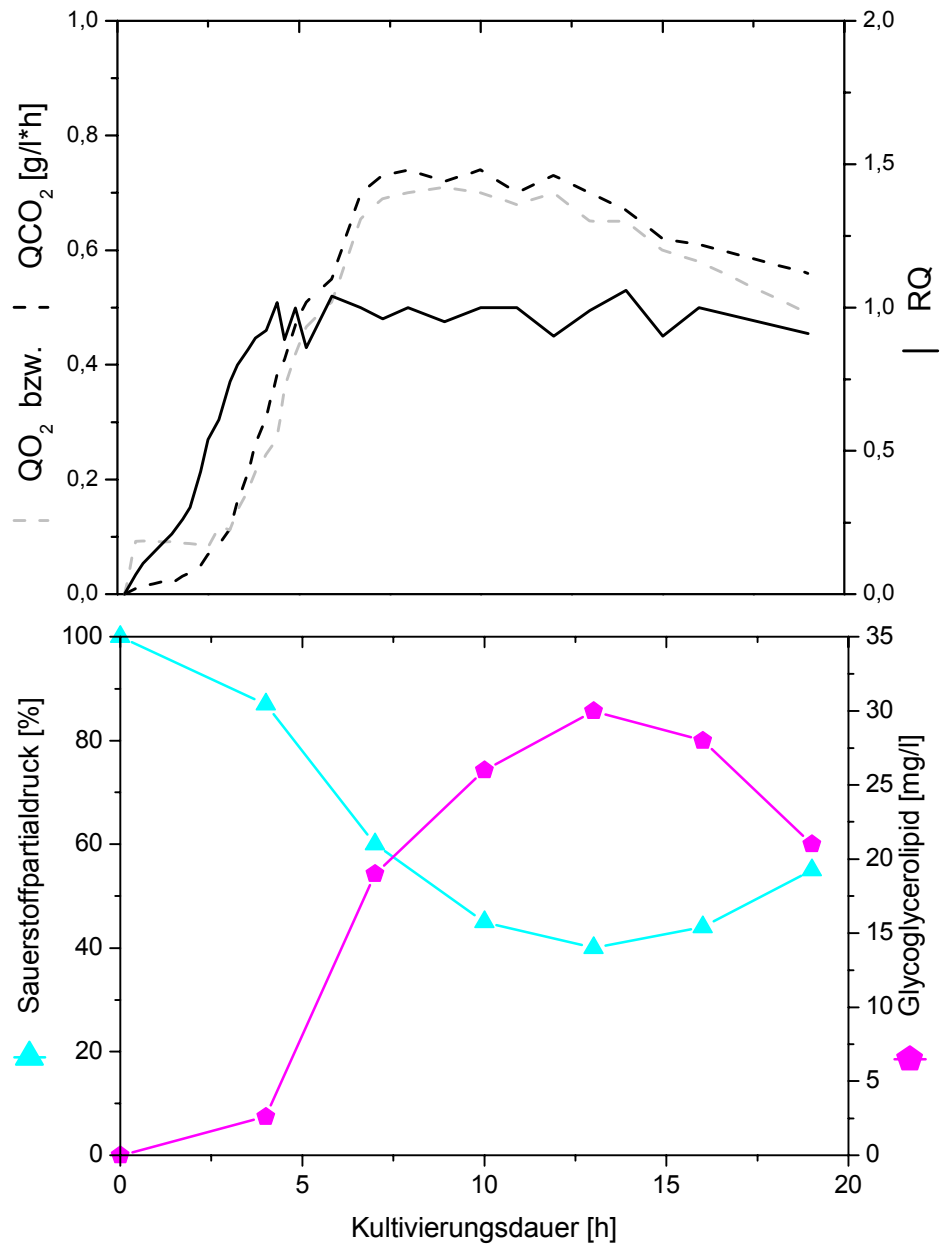


Abbildung III.9: QO_2 , QCO_2 , RQ, pO_2 und BTM der Batch-Kultivierung von *Bacillus subtilis* im Bioreaktor. Bedingungen: 50 l Bioreaktor; 40 l Marine Broth + 20 g/l Glucose; 27°C; 5 % Inokulum; pH 7.5; 500 Upm; 0.4 v/vm.

4.4 Isolierung und Charakterisierung des Glycoglycerolipids aus *Bacillus subtilis*

5.17 g Zellextrakt (Extraktion der Zellen mit MeOH), gewonnen aus 20 l Kulturbrühe der Bioreaktorkultivierung (Kapitel 4.3), wurden auf einer NP-Kieselgelsäule aufgetragen und mit dem Lösungsmittelgemisch $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (80/20) (v/v) eluiert. Eine der erhaltenen Fraktionen (C) wurde mittels MPLC (Kieselgel 60) mit dem Lösungsmittelgemisch $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (95/5) (v/v) chromatographisch aufgereinigt. In Tabelle III.9 sind die Ausbeuten, die daraus berechneten Konzentrationen in der Kulturbrühe sowie der R_F -Wert auf NP-Kieselgel im Laufmittelsystem $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/15/2) (v/v/v) angegeben. Aus 5.17 g Zellextrakt konnten 320 mg (16 mg/l) des Glycoglycerolipids GGL11 gewonnen werden.

Tabelle III.9: Ausbeute des im Zellextrakt von *Bacillus subtilis* erhaltenen Glycoglycerolipids.

| | Ausbeute (absolut) [mg] | Ausbeute (Kulturbrühe) [mg/l] | R_F-Wert |
|-----------------------|------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------|
| Zellrohextrakt | 5180 | 259 | |
| Fraktion C | 920 | 46 | 0.25 - 0.4 |
| Aus Fraktion C | | | |
| GGL11 | 320 | 16 | 0.31 |

NMR- und MS-Untersuchungen ergaben, dass es sich bei dem Molekül GGL11 in Abbildung III.10 um ein 1,2-O-diacyl-3-[[β -glucopyranosyl-(1-6)- β -glucopyranosyl]]-glycerin handelt. Die Tabellen VII.1 und VII.4 (Anhang) enthalten sämtliche NMR-spektroskopischen Daten. Die Zuordnung der NMR-Signale erfolgte über Kreuzpeaks der (^1H , ^1H)- und (^1H , ^{13}C)- COSY-Spektren. Bei GGL11 wurden keine ungesättigten Fettsäurereste gefunden. Anhand der Multiplizität des (ω -2)-C-Atoms konnte bei dieser Verbindung eine anteiso-Verzweigung der dominierenden Fettsäuren nachgewiesen werden. Das Molekül enthält einen Glycerinrest und eine Disaccharideinheit, die aus zwei 1''- 6' β -glycosidisch miteinander verknüpften Glucosemolekülen besteht. Die Identifizierung der Disaccharideinheit erfolgte über die H(1-2) Kopplungskonstante, die bei der Glucose 7.8 Hz betrug.

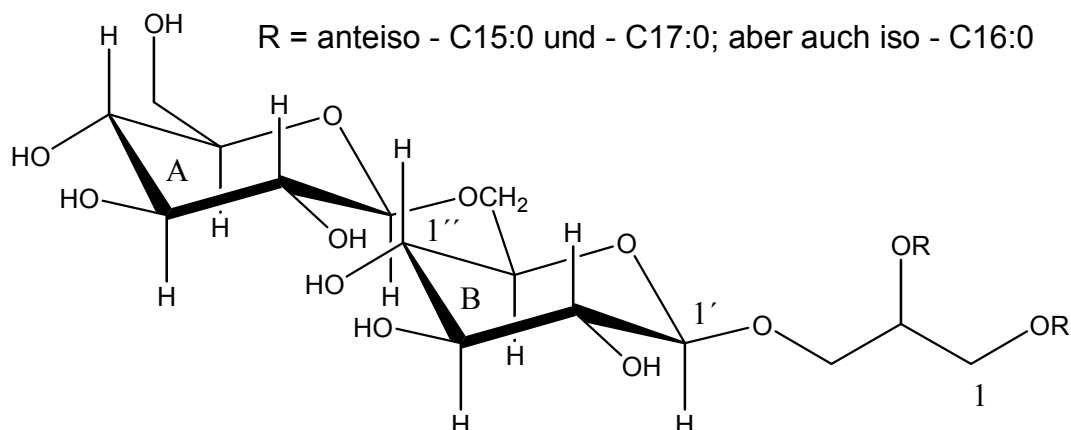


Abbildung III.10: Molekülstruktur des aus dem Zellextrakt des marinen *Bacillus subtilis* (Stamm AAS3) isolierten Glycoglycerolipids GGL11.

Während die anteiso-Verzweigung der Fettsäurereste aus dem NMR-Spektrum erkennbar war, ließ sich ihre prozentuale Zusammensetzung pro Molekül aus den massenspektrometrischen Daten ablesen. Tabelle VII.7 gibt eine Übersicht über die Verteilung der am häufigsten vorkommenden Fettsäuren in GGL11. Die Positionen der Fettsäuren konnten anhand der long range ^{13}C – ^1H Verschiebungskorrelationen (HMBC Spektrum) bestimmt werden. Dabei wurden Kreuzpeaks zwischen H-1 und C-1''' bzw. H-2 und C-2'''' beobachtet. Neben geringen Anteilen von iso-C 16:0 wurden hauptsächlich anteiso-C 15:0 und anteiso-C 17:0 Fettsäuren in GGL11 eingebaut.

Das Grundgerüst und die Substitutionsorte der Fettsäuren sind identisch mit der Grundstruktur des GGL, das von Brundish et al. [1968] bei einem *Bacillus subtilis* gefunden wurde.

Zusammenfassung

Das Eigenisolat AAS3 ist hinsichtlich der 16S rDNA Sequenzierung (Ähnlichkeit: 97 %) der Art *Bacillus subtilis* zuzuordnen. Aus dem Stamm AAS3 konnte das Glycoglycerolipid 1,2-O-diacyl-3-[β -glucopyranosyl-(1-6)- β -glucopyranosyl]-glycerin (GGL11; Abbildung III.10) in einer Konzentration von 16 mg/l isoliert werden. Das Fettsäuremuster am C 1 und C 2 bestand neben geringen Anteilen von iso-C 16:0 hauptsächlich aus anteiso-C 15:0 und anteiso-C 17:0 Fettsäuren.

5. Das Wachstumsverhalten des marinen *Bacillus subtilis* auf dem Synthetischen Meerwassermedium SM1

Da die Untersuchung der Einflüsse einzelner Medienbestandteile in einem Komplexmedium wie Marine Broth schwierig ist, wurde für die weiteren Untersuchungen ein definiert zusammengesetztes Medium benutzt, das als Grundlage die im natürlichen Meerwasser vorhandene Mineralsalzkonzentration aufweist. Als Zusätze wurden Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphatquelle sowie jeweils nach Bedarf verschiedene komplexe Bestandteile hinzugefügt. Durch Variation der einzelnen Medienbestandteile sollte ein hinsichtlich der Produktbildung optimiertes Medium gefunden werden.

Um das Absinken des pH-Werts bei der Verstoffwechselung von Glucose zu verhindern, wurde der pH-Wert in allen Schüttelkolbenkultivierungen durch manuelle pH-Korrektur (Titration von 1 %iger NaOH) auf Werte zwischen 7.0 und 7.5 eingestellt.

Als Basis wurde SM1 mit folgenden Zusätzen eingesetzt:

| | |
|------------------------------------------------------|-----------|
| NaCl | 23.00 g/l |
| KCl | 0.75 g/l |
| CaCl ₂ *2 H ₂ O | 1.47 g/l |
| MgCl ₂ *6 H ₂ O | 5.08 g/l |
| MgSO ₄ *7 H ₂ O | 6.16 g/l |
| Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O | 0.89 g/l |
| FeSO ₄ *7 H ₂ O | 0.03 g/l |
| NH ₄ Cl | 5.00 g/l |
| C-Quelle: Glucose | 20.00 g/l |

Neben der Biotrockenmasse wurde auch die Glycoglycerolipidproduktion von GGL11 als Optimierungsziel herangezogen und beide Parameter als spezifische Produktbildung zusammengefasst und angegeben. Das beste Ergebnis ergaben die Bedingungen, bei denen das Verhältnis von Produktmenge pro gebildeter Biotrockenmasse jeweils am größten war.

5.1 Zusätzliche komplexe Bestandteile

Da das Synthetische Meerwassermedium SM1 keine Vitamine, Aminosäuren oder Spurenelemente enthält, wurden diese in Form von komplexen Bestandteilen zugegeben. In dieser Arbeit wurden Hefeextrakt, Pepton und Marine Broth verwendet. In Tabelle III.10 ist der Einfluss verschiedener komplexer Zusätze auf das Wachstum von *Bacillus subtilis* aufgeführt.

Tabelle III.10: Verwertung verschiedener komplexer Bestandteile durch *Bacillus subtilis*.
Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; SM1; 27°C; 100 Upm; 24 - 48 h.

| Ansatz | BTM _{max} [g/l] |
|----------------------------------------|--------------------------|
| ohne | 3.96 |
| 1 g/l Pepton | 4.99 |
| 1 g/l Hefeextrakt | 6.54 |
| 0.5 g/l Hefeextrakt und 0.5 g/l Pepton | 5.72 |

Der Zusatz von Hefeextrakt führte zur höchsten Wachstumssteigerung. Die Biotrockenmasse stieg um 2.58 g/l auf 6.54 g/l (66 %) im Vergleich zur Kultivierung ohne komplexen Zusatz. Durch Pepton und die Kombination aus Hefeextrakt und Pepton konnte die Biomasse um 1.03 g/l auf 4.99 g/l (26 %) bzw. um 1.76 g/l auf 5.72 g/l (44 %) gesteigert werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde in weiteren Versuchen die optimale Hefeextraktkonzentration ermittelt. Abbildung III.11 zeigt eindeutig, dass eine zusätzliche Hefeextraktkonzentration von 10 g/l die höchste Ausbeute von 6.5 mg Glycoglycerolipid pro g BTM erbrachte. Obwohl höhere Hefeextraktkonzentrationen als 10 g/l ein besseres Wachstum erzielten (hier nicht gezeigt), wurde im Verhältnis weniger GGL11 gebildet. Die spezifische Produktbildung an GGL11 nahm mit Konzentrationen > 10 g/l kontinuierlich ab. Schließlich wurde bei einer Hefeextraktkonzentration von 50 g/l die niedrigste spezifische Produktbildung von 2.0 mg/g an

GGL11 erzielt. Konzentrationen < 10 g/l bewirkten ein schwächeres Wachstum und eine schlechtere spezifische Produktbildung.

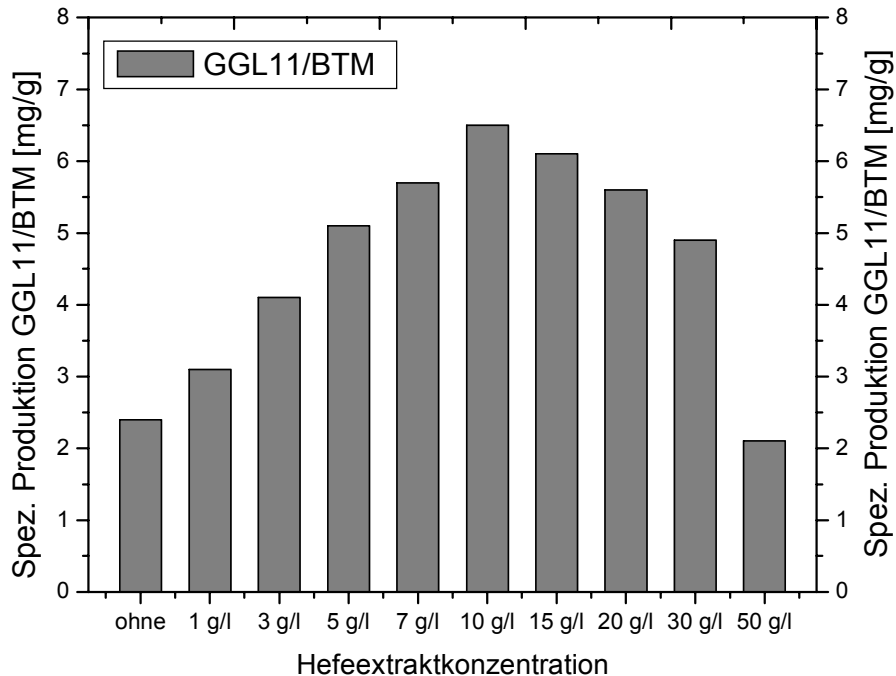


Abbildung III.11: Spezifische Produktbildung von GGL11 in Abhängigkeit der Hefeextraktkonzentration. Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; SM1 + 20 g/l Glucose; 27°C; 100 Upm; 24 - 48 h.

5.2 Einsatz verschiedener Glucosekonzentrationen

Um die spezifische Produktbildung an GGL11 in Abhängigkeit von der Glucosekonzentration zu bestimmen, wurden Schüttelkolbenkultivierungen auf SM1 mit 10 g/l Hefeextrakt und verschiedenen Konzentrationen an Glucose durchgeführt. In Abbildung III.12 werden der Verlauf der spezifischen Produktbildung an GGL11 wiedergegeben. Die maximale spezifische Produktbildung wurde mit einer Glucosekonzentration von 20 g/l erreicht, die auch schon zuvor als Standard eingesetzt wurde. Dabei konnte eine Ausbeute an GGL11 von 6.5 mg/g Biotrockenmasse ermittelt werden. Glucosekonzentrationen > 20 g/l bewirkten zwar eine weitere Zunahme der Biotrockenmasse, aber die Produktmenge an GGL11 nahm in einem kleineren Verhältnis zu, so dass die spezifische Produktbildung mit

zunehmenden Glucosekonzentrationen stetig abnahm. Bei einer Konzentration von 50 g/l betrug die Ausbeute an GGL11 4.9 mg/g BTM.

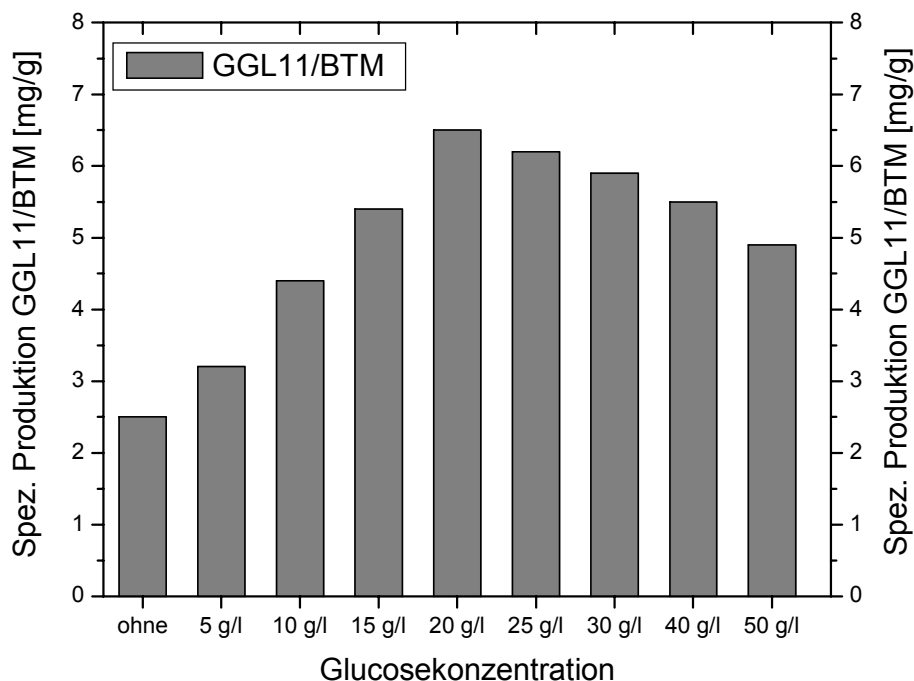


Abbildung III.12: Spezifische Produktbildung von GGL11 in Abhängigkeit der Glucosekonzentration. Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; SM1 + 10 g/l Hefeextrakt; 27°C; 100 Upm; 24-48 h.

5.3 Einfluss der Inkubationstemperatur

Um den Einfluss der Temperatur auf die Produktbildung von *Bacillus subtilis* zu bestimmen, wurde ein Temperaturprofil von 4°C bis 37°C erstellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung III.13 dargestellt. Die Produktbildung von *Bacillus subtilis* wies eine hohe Temperaturtoleranz auf. Bei allen untersuchten Temperaturen betrug die spezifische Produktbildung an GGL11 mehr als 4.9 mg/g BTM. Die spezifische Produktausbeute war mit 7.4 mg/g BTM bei 30°C am höchsten. Die bei den niedrigen Temperaturen von bis zu 4°C festgestellte Produktbildung war gleichzeitig mit einer kontinuierlichen Verlängerung der Kultivierungsdauer verbunden.

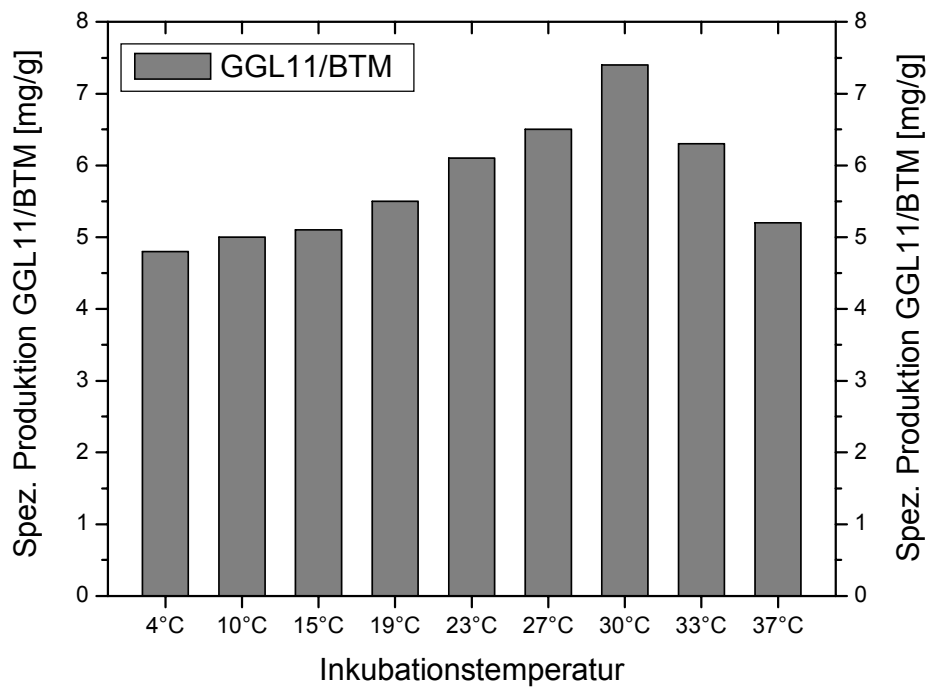


Abbildung III.13: Spezifische Produktbildung von GGL11 in Abhängigkeit der Inkubationstemperatur. Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; SM1 + 20 g/l Glucose + 10 g/l Hefeextrakt; 100 Upm; 24-72 h.

5.4 Einfluss der Mineralsalzkonzentration

Da die Art *Bacillus subtilis* aus terrestrischen Proben wohl bekannt ist, sollte bei dem marinem Stamm die Veränderung des Mineralsalzgehaltes im Medium auf die Glycoglycerolipidbildung untersucht werden. Gewählt wurden die doppelte, die halbe bzw. ein Zehntel der im natürlichen Meerwasser vorkommenden Mineralsalzkonzentration. Abbildung III.14 zeigt, dass der marine Stamm *Bacillus subtilis* hohe Mineralsalzkonzentrationen ohne Beeinträchtigung von Wachstum und Produktbildung toleriert. Bis zu der im Meerwasser vorherrschenden Mineralsalzkonzentration konnte kein Absinken der spezifischen Produktausbeute festgestellt werden. Sie lag sowohl für die natürliche als auch die halbe bzw. ein Zehntel der im Meerwasser vorherrschenden Mineralsalzkonzentration bei 7.4 mg/g Biotrockenmasse. Erst bei der doppelten Mineralsalzkonzentration ist eine geringere Produktausbeute festzustellen. Sie lag bei 6.1 mg/g BTM an GGL11.

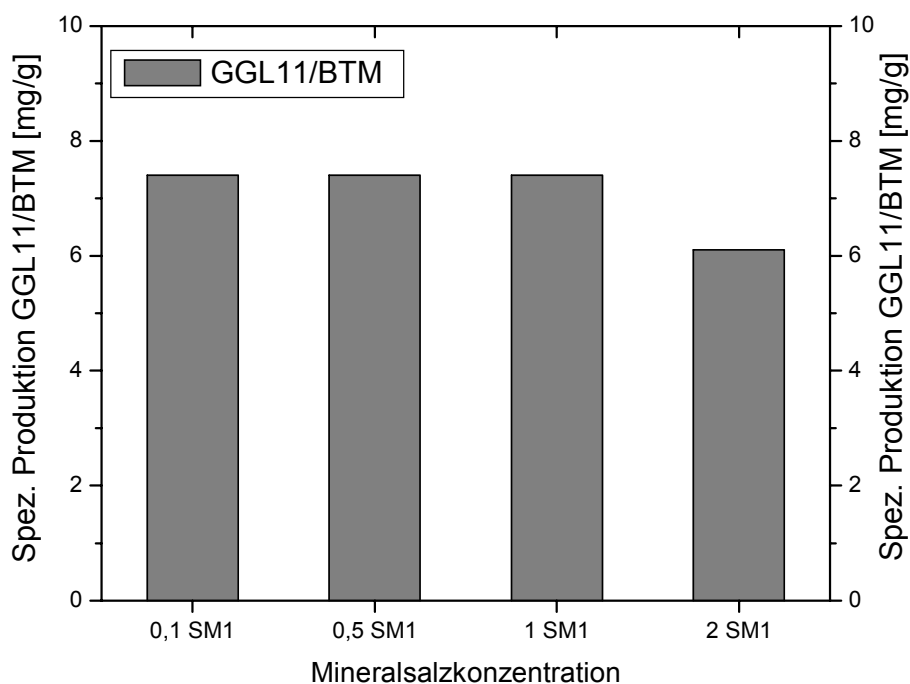


Abbildung III.14: Spezifische Produktbildung von GGL11 in Abhängigkeit der Mineralsalzkonzentration. Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; 20 g/l Glucose + 10 g/l Hefeextrakt; 30°C; 100 Upm; 24-48 h.

5.5 Einfluss der Stickstoffquelle

Außer der bisher verwendeten Stickstoffquelle NH_4Cl wurden NaNO_3 , NH_4NO_3 und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ getestet. Bei allen Ansätzen betrug die Konzentration bezogen auf den Stickstoffanteil immer 94 mmol/l. Die Ergebnisse sind in Abbildung III.15 dargestellt. Alle eingesetzten Stickstoffquellen begünstigten das Wachstum von *Bacillus subtilis*. Dabei zeigte NH_4Cl mit 7.4 mg/g BTM die höchste Produktausbeute. Lediglich NaNO_3 fiel mit 5.9 mg/g BTM an GGL11 leicht ab. Dies lässt auf eine leichtere Verwertbarkeit von Ammoniumionen schließen.

Wie in Abb. III.16 dargestellt, wurde außerdem die Konzentration an zugesetztem NH_4Cl im Bereich von 0 bis 10 g/l (0 - 715 mmol N/l) variiert. Die spezifische Produktbildung erreichte ihren höchsten Wert mit 7.4 mg/g BTM bei einer Ausgangskonzentration von 5 g/l NH_4Cl .

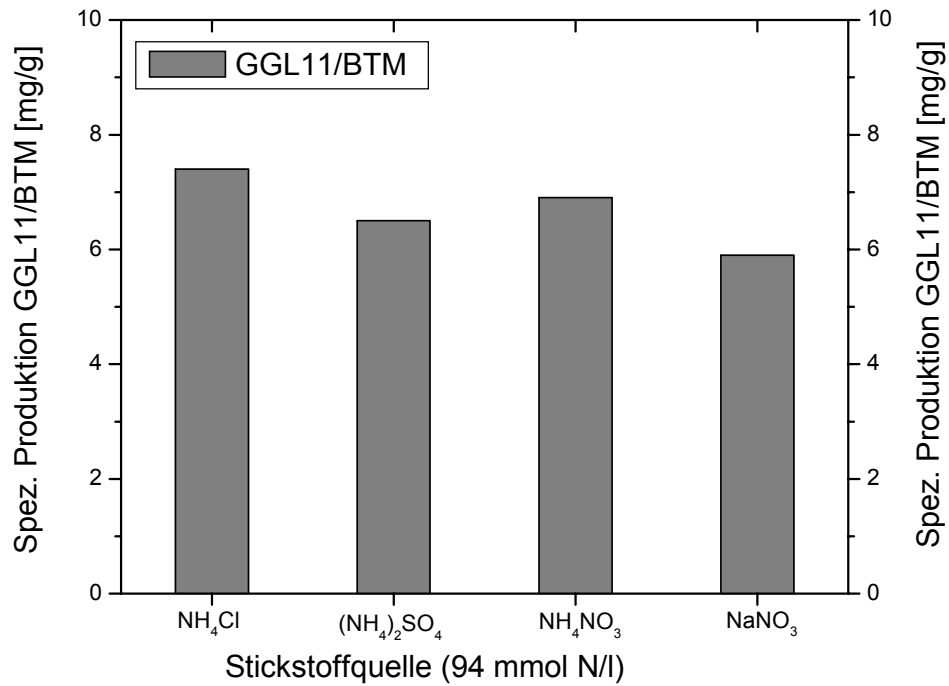


Abbildung III.15: Spezifische Produktbildung von GGL11 in Abhängigkeit der Stickstoffquelle. Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; SM1 + 20 g/l Glucose + 10 g/l Hefeextrakt; 30°C; 100 Upm; 24-48 h.

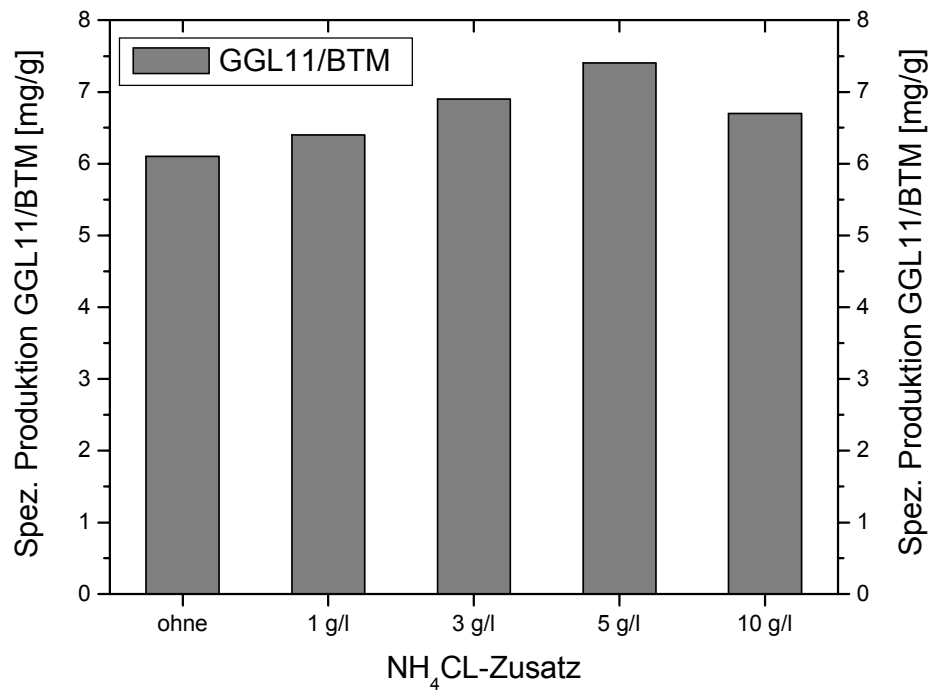


Abbildung III.16: Spezifische Produktbildung von GGL11 in Abhängigkeit der NH_4Cl -Konzentration. Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; SM1 + 20 g/l Glucose + 10 g/l Hefeextrakt; 30°C; 100 Upm; 24-48 h.

5.6 Einfluss der Phosphatquelle

Kulturansätze mit einer Na_2HPO_4 -Konzentration von 0 bis 1.78 g/l wurden auf ihren Einfluss hinsichtlich der Produktausbeute untersucht. Die Ergebnisse werden in Abbildung III.17 dargestellt. Die höchste spezifische Produktbildung von 7.4 mg/g BTM wurde bei einer Ausgangskonzentration von 0.89 g/l Na_2HPO_4 erreicht.

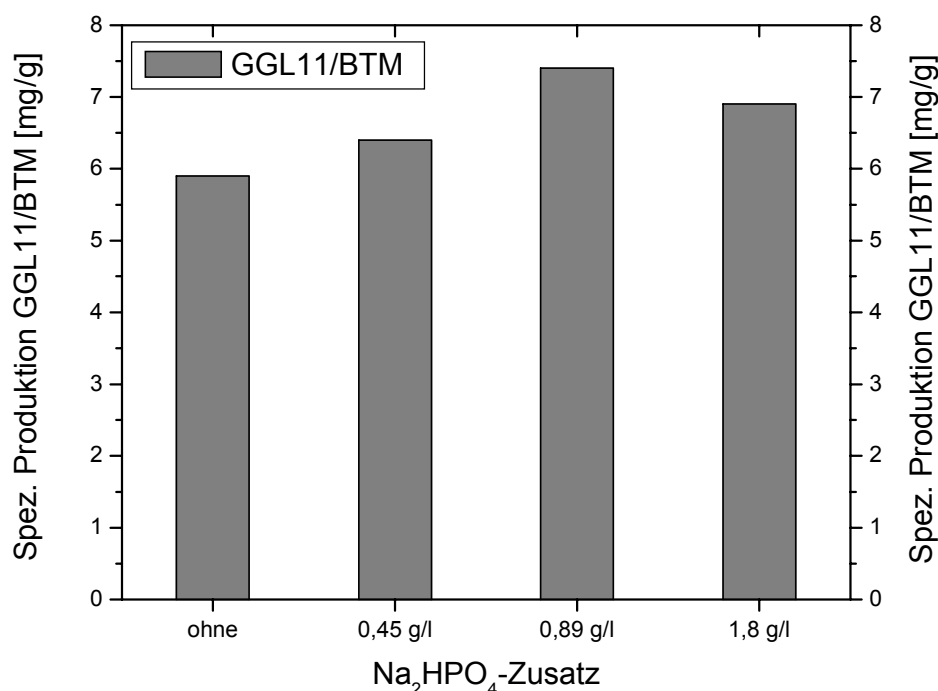


Abbildung III.17: Spezifische Produktbildung von GGL11 in Abhängigkeit der Phosphatquelle. Bedingungen: 250 ml Schüttelkolben; SM1 + 20 g/l Glucose + 10 g/l Hefeextrakt; 30°C; 100 Upm; 24-48 h.

Zusammenfassung

Nach den durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich einer Optimierung der spezifischen Produktbildung an GGL11 für *Bacillus subtilis* können im Schüttelkolbenmaßstab folgende Bedingungen empfohlen werden:

- 20 g/l Glucose als C-Quelle
- 10 g/l Hefeextrakt als zusätzlicher komplexer Bestandteil
- 5 g/l NH_4Cl als zusätzliche Stickstoffquelle

- 0.89 g/l Na_2HPO_4 als zusätzliche Phosphatquelle
- SM1 mit 10 % der herkömmlichen Mineralsalzkonzentration
- 30°C als Inkubationstemperatur

6. Bioreaktorkultivierung des marinen *Bacillus subtilis* auf SM1

Die im letzten Kapitel empfohlenen Bedingungen sollten in einem vergrößerten Maßstab überprüft werden. Hierfür wurde ein 50 l Bioreaktor gewählt. Die Parameter pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck im Reaktor sowie die Abgasdaten in Form von Sauerstoffaufnahme und Kohlendioxidbildungsrate wurden online aufgezeichnet. Die folgenden Einstellungen (Erfahrungswerte für Upm und v/vm) wurden gewählt:

| | |
|------------------------|------------------------------------|
| Arbeitsvolumen: | 30 l |
| Inokulum: | 5 % |
| Inkubationstemperatur: | 30°C |
| pH-Korrektur: | 7.5 ± 0.2 |
| Belüftungsrate: | 0.4 v/vm |
| Rührerdrehzahl: | 500 Upm |
| C-Substrat: | 20 g/l Glucose |
| N-Substrat: | 5 g/l NH_4Cl |
| Komplexer Bestandteil: | 10 g/l Hefeextrakt |
| Phosphat: | 0.89 g/l Na_2HPO_4 |
| Mineralsalzanteil: | SM1 |

Wachstumsverlauf, Substratverbrauch und Produktbildung sind in den Abbildungen III.18 und III.19 dargestellt. Nach kurzer lag-Phase setzte ab ca. der zweiten Stunde für kurze Zeit das exponentielle Wachstum ein. Die maximale Biotrockenmasse von 10.5 g/l bzw. die maximale Proteinkonzentration von 3.4 g/l wurden nach 11 h gemessen. Dabei fiel der Sauerstoffpartialdruck bis auf 39 % (13 h), um dann bis zum Ende der Kultivierung nach 21 h auf 79 % anzusteigen.

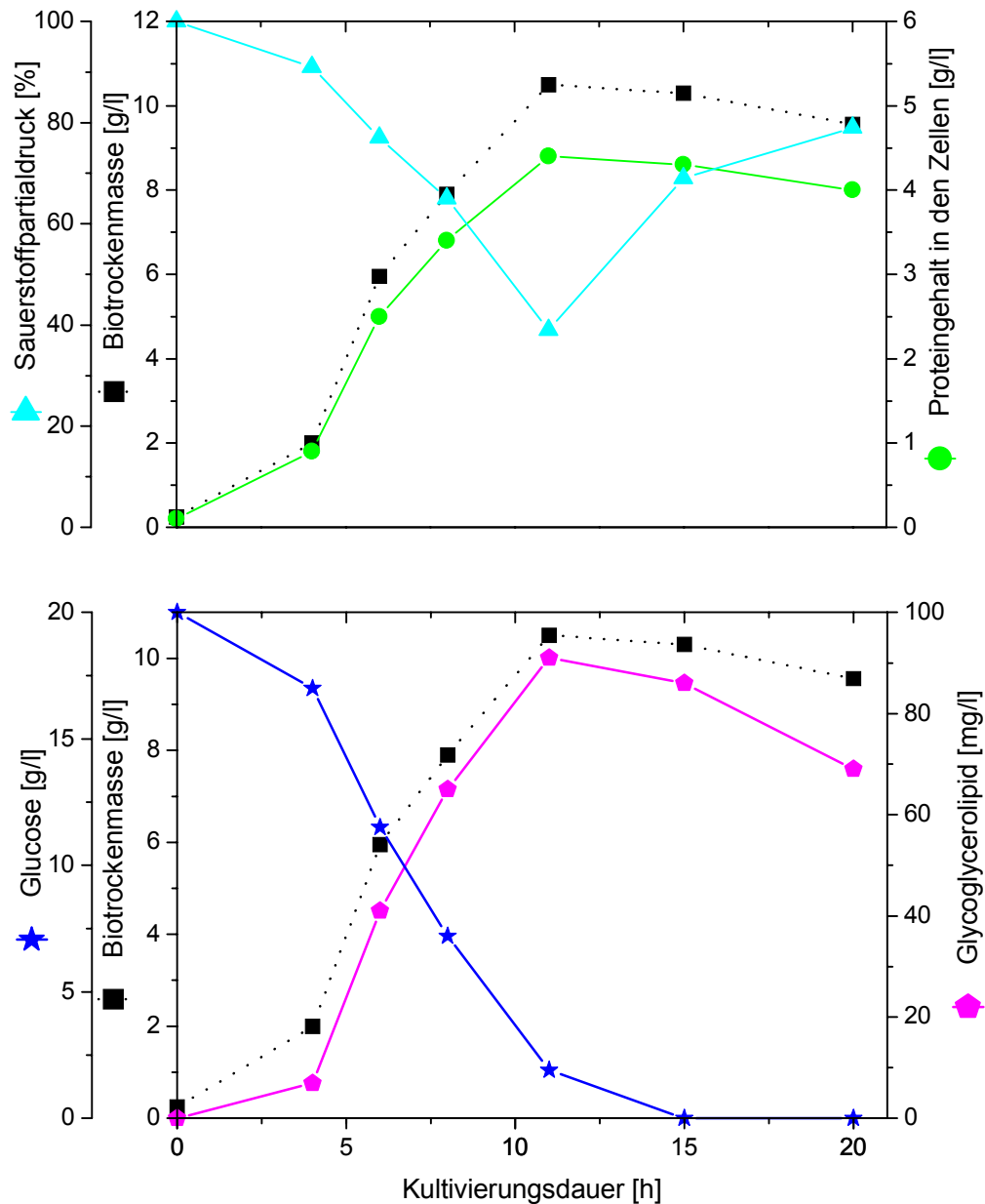


Abbildung III.18: Wachstum, Glucoseverbrauch und Produktbildung von *Bacillus subtilis* im 50 l Bioreaktor auf SM1. Bedingungen: SM1 + 20 g/l Glucose + 10 g/l Hefeextrakt; 30°C; pH 7.5; 500 Upm; 0.4 v/vm.

Die spezifische Wachstumsrate μ erreichte nach 6 h bezogen auf die Biotrockenmasse einen Wert von 0.55 1/h. Die Konzentration an Glucose nahm entgegengesetzt zum Verlauf der Biotrockenmasse ab und war nach 15 h vollständig aufgebraucht. Wie bereits bei Kultivierungen auf dem Komplexmedium Marine Broth beobachtet, zeigte auch in diesem Fall die Glycoglycerolipidproduktion einen wachstumsgekoppelten Verlauf. Die maximale Ausbeute an GGL11 mit 91 mg/l

wurde nach 11 h erreicht. Auffällig ist der starke Abfall der Glycoglycerolipidkonzentration am Ende der Kultivierung (21 h). In Abbildung III.19 sind außerdem die aus der Abluft berechneten Q_{O_2} , Q_{CO_2} und RQ des Mikroorganismus wiedergegeben. Zum Zeitpunkt der maximalen spez. Produktbildung nach 11 h ist der pO_2 am niedrigsten und Q_{O_2} bzw. Q_{CO_2} erreichen ihre Maxima.

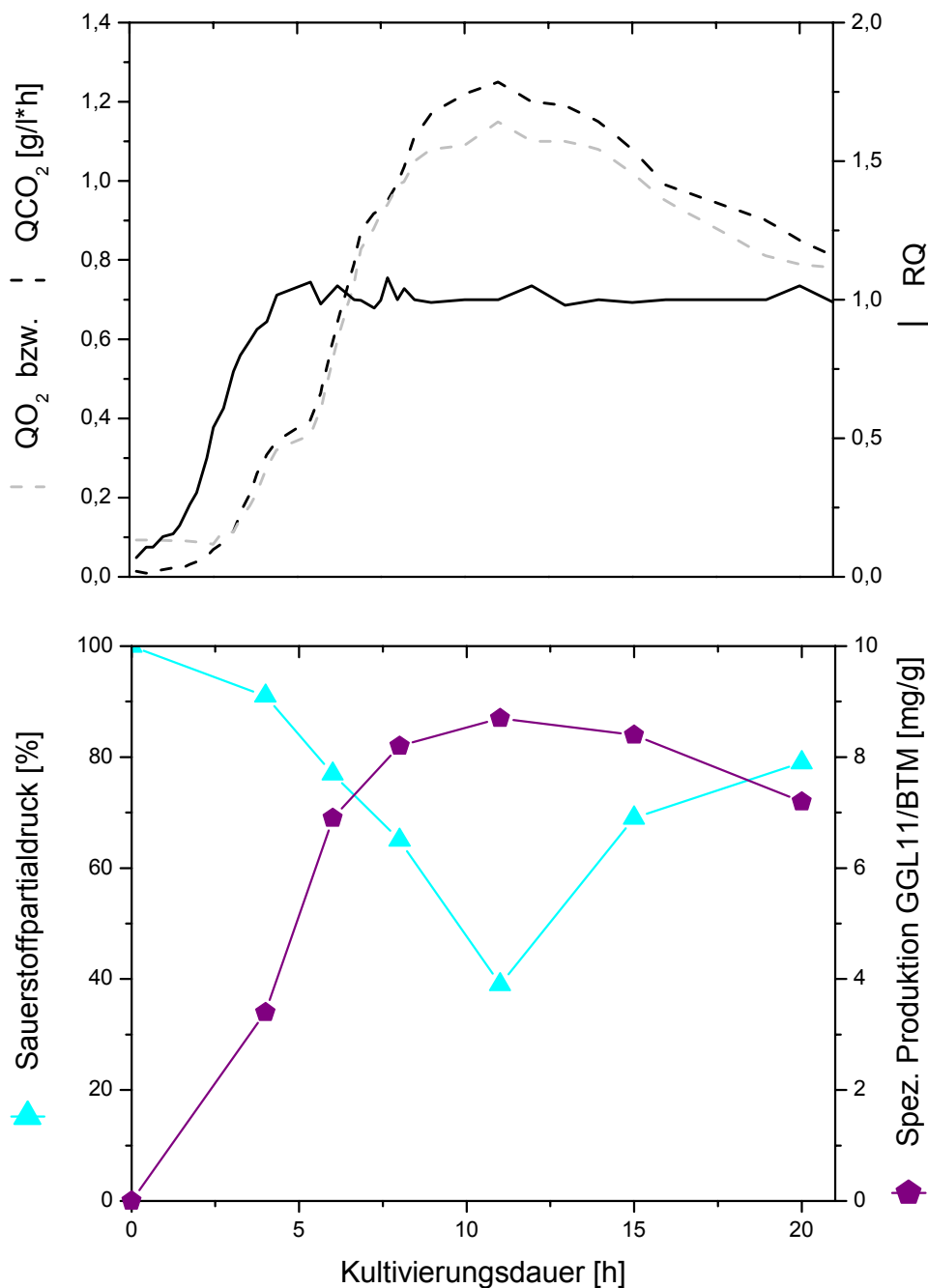


Abbildung III.19: Q_{O_2} , Q_{CO_2} , RQ und pO_2 und spezifische Produktbildung von *Bacillus subtilis* im 50 l Bioreaktor.

Die spezifische Produktbildung wies mit 8.7 mg GGL11 pro g Biotrockenmasse ihr Maximum nach 11 h auf. Dies entspricht einem Anstieg im Vergleich zu der optimierten Kultivierung im Schüttelkolben von 18 % (von 7.4 mg/g auf 8.7 mg/g).

Zusammenfassung

Die wichtigsten Daten der Bioreaktorkultivierungen auf Marine Broth und SM1 sind in Tabelle III.11 zusammengefasst.

Tabelle III.11: Gegenüberstellung der Bioreaktorkultivierungen des marinen *Bacillus subtilis*.

| Parameter | Bioreaktor 1 Marine Broth | Bioreaktor 2 SM1(optimiert) |
|----------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Reaktorlaufzeit | 19 h | 20 h |
| BTM _{max} | 7.6 g/l | 10.5 g/l |
| GGL11 _{max} | 30 mg/l | 91 mg/l |
| μ_{\max} | 0.46 1/h | 0.55 1/h |
| P _V | 2.31 mg/[l*h] | 8.27 mg/[l*h] |
| Y _{P/X} | 4.0 mg/g | 8.7 mg/g |
| Y _{P/S} | 1.7 mg/g | 5.1 mg/g |

7. Modifikation des Glycoglycerolipids GGL11 aus dem marinen *Bacillus subtilis*

Zunächst wurde angestrebt, aus dem Glycoglycerolipid das Glycoglycerin (GG11) mittels chemischer bzw. enzymatischer Hydrolyse herzustellen. Anschließend sollten durch enzymatische Acylierung ungewöhnliche Fettsäuren in GG11 eingeführt werden.

7.1 Darstellung des Glycoglycerins GG11 durch alkalische Verseifung

Zur Gewinnung des Glycoglycerins wurde eine alkalische Verseifung (Kapitel II.10.1) durchgeführt. Die Reaktion ist in Abbildung III.20 dargestellt.

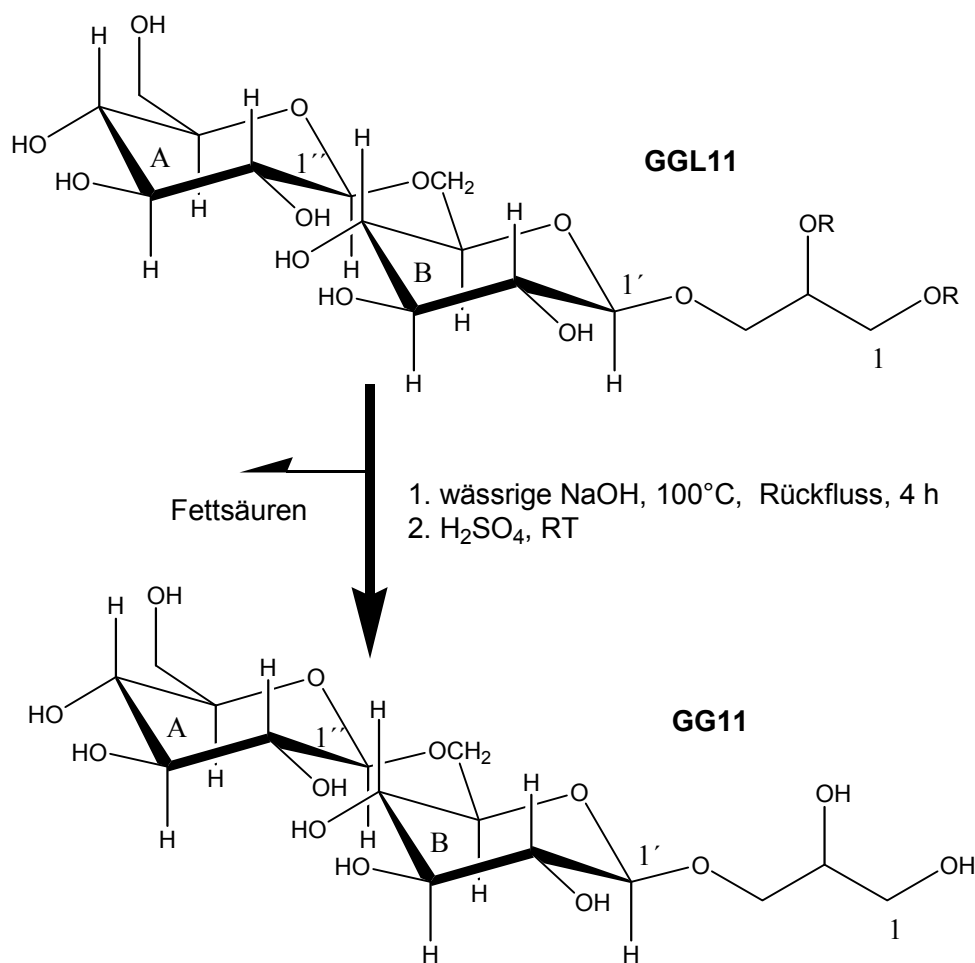


Abbildung III.20: Alkalische Verseifung des Glycoglycerolipids aus *Bacillus subtilis*.
R = anteiso - C15:0 und - C17:0; aber auch iso - C16:0

Die Umsetzung erfolgte zu 100 %. Es waren keine Nebenprodukte vorhanden. Die Ausbeute an GG11 betrug aufgrund der vielen Reinigungsschritte 35 %. In Abbildung III.21 ist ein Dünnschichtchromatogramm der alkalischen Verseifung von GGL11 schematisch dargestellt.

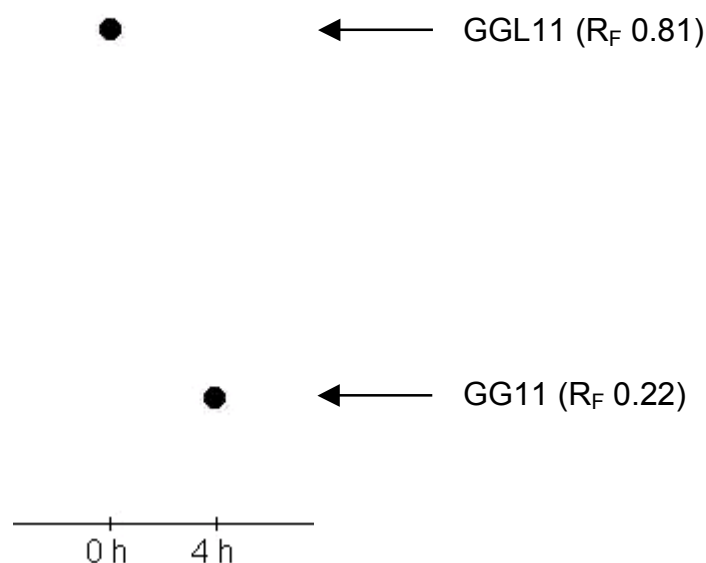


Abbildung III.21: Dünnschichtchromatogramm der alkalischen Verseifung von GGL11 auf NP-Kieselgel; Laufmittelsystem: CHCl₃/MeOH/H₂O (30/15/1) (v/v/v); Detektionsmittel: α -Naphthol.

7.2 Darstellung des GG11 durch enzymatische Hydrolyse

Um das geeignete Lösungsmittel für die enzymatische Hydrolyse zu finden, wurden Ansätze im mg-Maßstab mit verschiedenen Lösungsmitteln getestet. In Tabelle III.12 ist eine Übersicht der Ergebnisse der verschiedenen Ansätze aufgeführt. Dabei zeigte sich, dass Phosphatpuffer (pH 7.0) für die enzymatische Hydrolyse von GGL11 nicht geeignet ist. Nur die Ansätze in tert-Amylalkohol (H₂O < 1 %) und Tetrahydrofuran (H₂O < 1 %) wiesen eine Umsetzung auf. Tert-Amylalkohol zeigte als einziges Lösungsmittel eine vollständige Umsetzung in der enzymatischen Hydrolyse von GGL11.

Tabelle III.12: Enzymatische Hydrolyse von GGL11 in verschiedenen Lösungsmitteln.
Bedingungen: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GGL11 + 5 mg Novozym Lipase 435; 55°C; 100 Upm; 24 h

| Ansatz | Umsetzung |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| 1.5 ml Phosphatpuffer (pH 7.0) | - |
| 1.5 ml dest. H ₂ O/tert-Amylalkohol (1/1) | - |
| 1.5 ml tert-Amylalkohol/ dest. H ₂ O (10/1) | - |
| 1.5 ml dest. H ₂ O/Tetrahydrofuran (1/1) | - |
| 1.5 ml tert-Amylalkohol (H ₂ O < 1 %) | ++ |
| 1.5 ml Tetrahydrofuran (H ₂ O < 1 %) | + |
| 1.5 ml MTB-Ether (H ₂ O < 1 %) | - |
| 1.5 ml n-Hexan (H ₂ O < 1 %) | - |

++ vollständig, + teilweise, - keine

Anschließend erfolgte die Darstellung des Glycoglycerins im Standardansatz (Kapitel II.10.2). Der Reaktionsverlauf ist in den Abbildungen III.22 und III.23 aufgeführt.

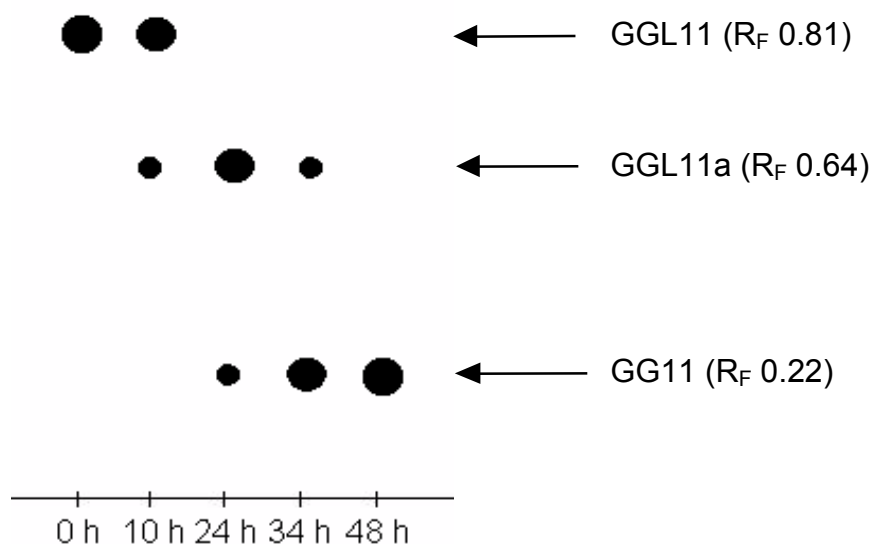
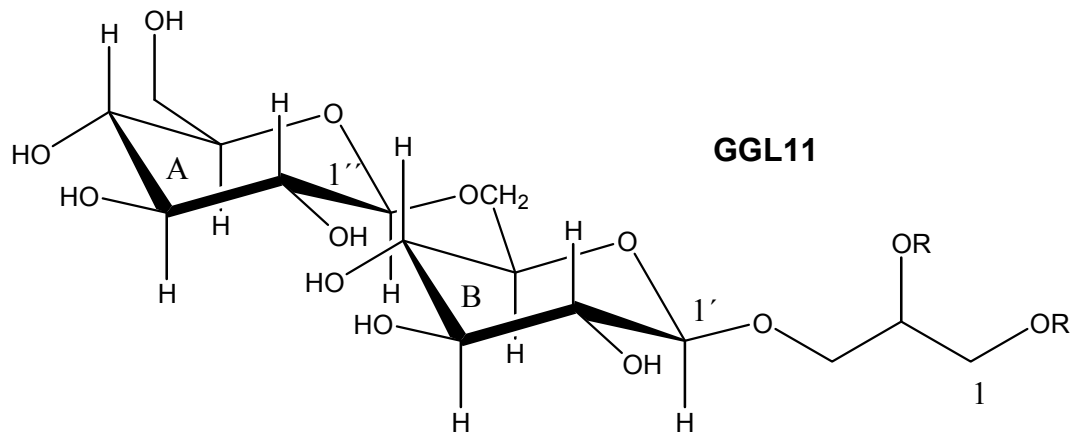


Abbildung III.22: Dünnschichtchromatogramm zum zeitlichen Verlauf der enzymatischen Hydrolyse von GGL11 auf NP-Kieselgel; Laufmittelsystem: CHCl₃/MeOH/H₂O (30/15/1) (v/v/v); Detektionsmittel: α-Naphthol.



Lipase 435, 55°C, 24 - 48 h
+
tert-Amylalkohol (H₂O < 1%)

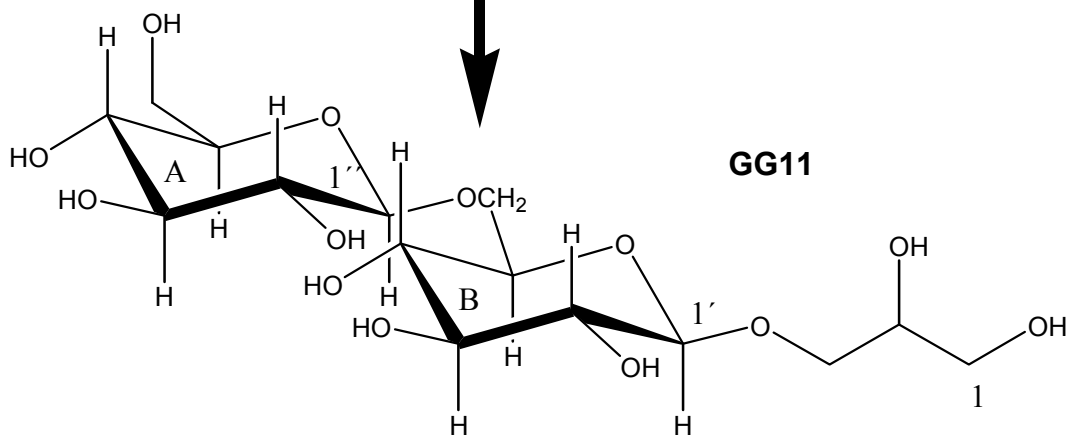
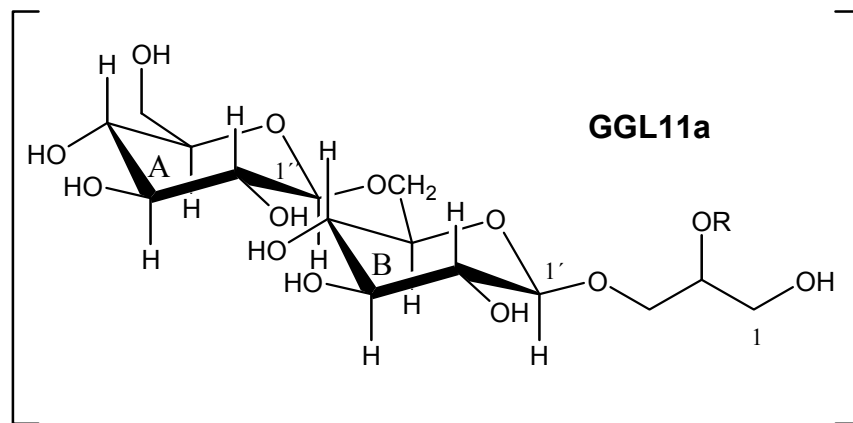


Abbildung III.23: Enzymatische Hydrolyse des Glycoglycerolipids aus *Bacillus subtilis*.
R = anteiso - C15:0 und - C17:0; aber auch iso - C16:0. Ein Strukturnachweis von
GGL11a wurde nicht geführt. Der R_F-Wert legt diese Struktur nahe.

Innerhalb von 48 h erfolgte die vollständige Umsetzung des GGL11 zum Glycoglycerin. Die Reaktion verlief in zwei Stufen. Bereits nach 10 h war die Bildung des Zwischenprodukts GGL11a zu erkennen. Daraufhin setzte die Umsetzung des GGL11a zu GG11 ein (24 h). Nach 48 h waren die Verbindungen GGL11 und GGL11a nicht mehr nachweisbar. Die Ausbeute an GG11 betrug 84 %.

Die NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Daten von GG 11 sind im Anhang dargestellt (Tabellen VII.3, VII.6 und VII.7). Das ^{13}C NMR Spektrum zeigte 15 Signale mit den Multiplizitäten (DEPT-135 Spektrum) und charakteristischen chemischen Verschiebungen, die mit einer Disaccharideinheit und einem Glycerinrest übereinstimmen. Aufgrund der charakteristischen Tieffeld Verschiebung des C-6' (69.5 ppm) im Vergleich zum freien C-6'' (61.9 ppm) besteht das Disaccharid aus zwei 1''- 6' β -glycosidisch miteinander verknüpften Zuckern. Deren Identifizierung erfolgte über die H(1-2) Kopplungskonstante, die für die Glucose charakteristische 7.8 Hz betrug. Die Kreuzpeaks zwischen H-1' und C-3 bzw. H-3 und C-1' der long range ^{13}C - ^1H Verschiebungskorrelationen (HMBC Spektrum) belegten die Bindung zwischen der Disaccharideinheit mit dem Glycerinrest.

In einem weiteren Versuch wurde das Temperaturoptimum für die enzymatische Hydrolyse von GGL11 ermittelt. Das Temperaturprofil ist in Abbildung III.24 dargestellt. Das Temperaturoptimum für die enzymatische Hydrolyse von GGL11 liegt bei 55°C. Bei dieser Temperatur wurde die vollständige Umsetzung nach 48 h erreicht. Bei der Reaktionstemperatur von 70°C stellte sich das Reaktionsgleichgewicht nach 34 h bei einem maximalen Umsatz von 75 % ein. Bei der Reaktionstemperatur von 40°C wurde nach 72 h ebenfalls eine vollständige Umsetzung beobachtet.

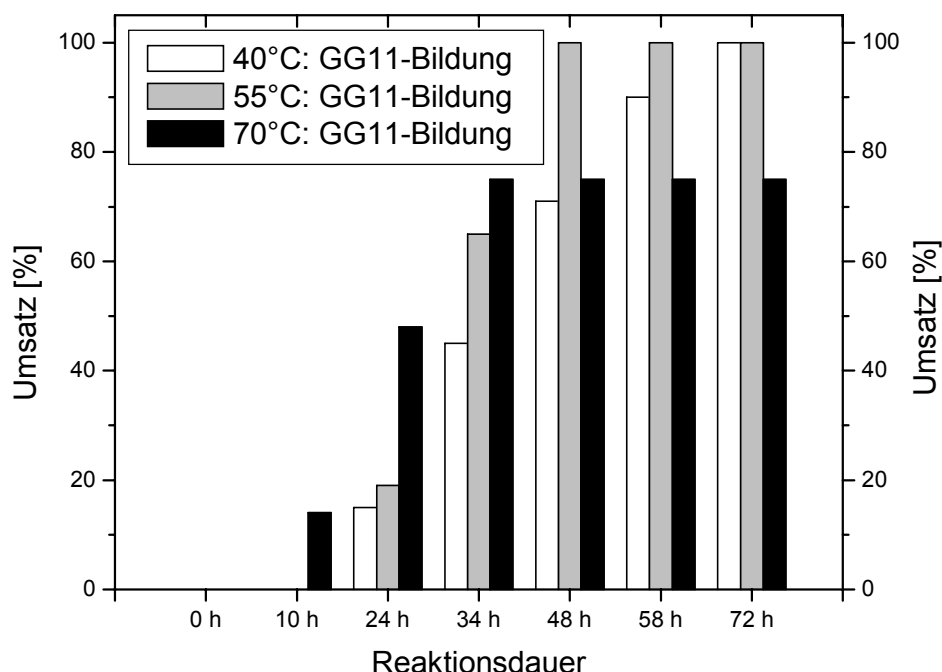


Abbildung III.24 Einfluss der Temperatur auf die enzymatische GG11-Bildung.
Bedingungen: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GGL11 + 5 mg Novozym Lipase 435; 1.5 ml tert-Amylalkohol; 100 Upm.

7.3 Enzymatische Acylierung des Glycoglycerins GG11

Durch erste Vorversuche sollte gezeigt werden, welches Lösungsmittel für die enzymatische Acylierung des Glycoglycerins GG11 geeignet war. Da GG11 ein sehr polares Molekül ist, wurde anhand der Löslichkeit des Glycoglycerins in verschiedenen Lösungsmitteln entschieden, welche organischen Lösungsmittel für die enzymatische Acylierung als geeignet erschienen. Deshalb wurde die Löslichkeit des GG11 in 7 Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität untersucht, wobei 50 mg GG11 in 20 ml Lösungsmittel vorgelegt wurden. Als Referenzlösungsmittelgemisch diente dest. H₂O, in dem sich die obige Menge vollständig löste (100 % Löslichkeit). In Abbildung III.25 sind die eingesetzten Lösungsmittel nach ihren Polaritäten aufgelistet. Die Inkubationstemperatur betrug 60°C (Ausnahmen: geringerer Siedepunkt).

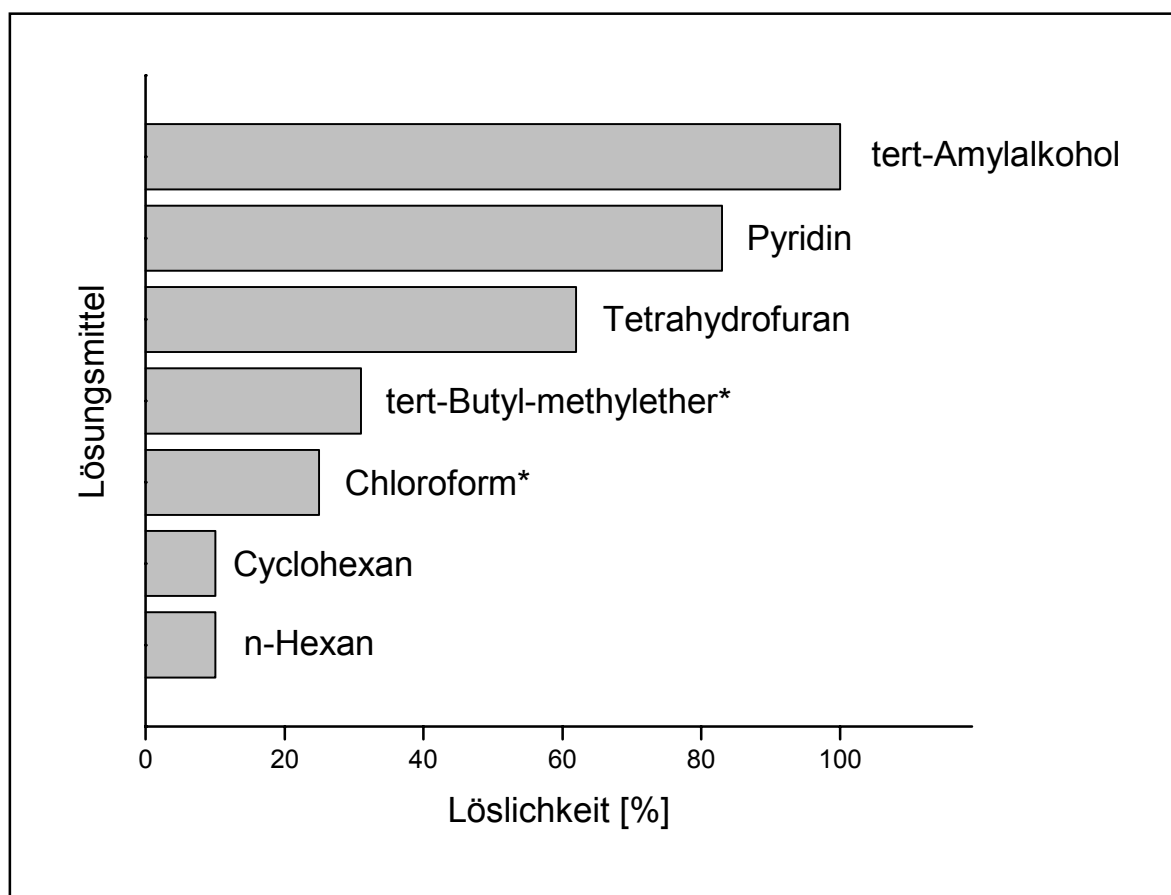


Abbildung III.25: Löslichkeit von GG11 in Abhängigkeit vom Lösungsmittel.
Bedingungen: 50 mg GG11 in 20 ml Lösungsmittel; Inkubationszeit: 30 min;
T = 50°C; * T = 37°C.

In tert-Amylalkohol wurde GG11 vollständig gelöst. Alle anderen Lösungsmittel zeigten niedrigere Löslichkeiten, wobei die Löslichkeiten in Richtung unpolare Lösungsmittel rapide abnahmen. Als geeignete Lösungsmittel für die enzymatische Acylierung von GG11 wurden tert-Amylalkohol, Pyridin und Tetrahydrofuran ausgewählt.

Anschließend wurden in den genannten Lösungsmitteln verschiedene Fettsäuren bzw. Fettsäureester auf ihre Eignung für die enzymatische Acylierung von GG11 getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle III.13 aufgeführt.

Tabelle III.13: Umsetzung verschiedener Fettsäuren bzw. -ester in den Lösungsmitteln tert-Amylalkohol, Pyridin und Tetrahydrofuran mit GG11 (enzymatische Acylierung).
Bedingungen: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GG11 + 5 mg Fettsäure; 5 mg Novozym Lipase 435 + aktiviertes Molsieb; 1.5 ml Lösungsmittel; 50°C; 48 h; 100 Upm.

| Fettsäure bzw. -ester | Umsetzung in | | |
|------------------------------------|--------------|---------|------------------|
| | THF | Pyridin | tert-Amylalkohol |
| Epiminooctadecansäuremethylester | - | - | - |
| Diepiminooctadecansäuremethylester | - | - | - |
| Linolsäure | - | - | +/- |
| Linolensäure | - | - | +/- |
| 14-Methylhexadecansäure | - | - | - |
| 10-Undecensäure | - | - | +/- |
| Monomethylpimelat | - | - | +/- |
| Methyl-5-Bromvalerat | - | - | +/- |
| 5-Bromvaleriansäure | - | - | - |
| 6-Bromhexansäure | - | - | - |
| Trans-2-Hexensäure | - | - | - |
| 5-Hexensäure | - | - | - |
| 4-Pentensäure | + | +/- | ++ |
| Trans-2-Pentensäure | - | - | - |
| 4-Pentensäure | - | - | - |

++ vollständig, + teilweise, +/- schwach, - keine

Als einzige Fettsäure konnte die 4-Pentensäure in allen 3 Lösungsmitteln umgesetzt werden. Wobei die Umsetzung in tert-Amylalkohol vollständig verlief. Alle anderen Fettsäuren zeigten in den Lösungsmitteln Tetrahydrofuran und Pyridin keine Reaktion. Lediglich eine schwache Umsetzung in tert-Amylalkohol wurde mit Linolsäure, Linolensäure, 10-Undecensäure, Monomethylpimelat und Methyl-5-Bromvalerat beobachtet.

Daraufhin wurde das Glycoglycerin GG11 mit 4-Pentensäure, Linolsäure, Linolensäure, 10-Undecensäure, Monomethylpimelat und Methyl-5-Bromvalerat im Standardansatz umgesetzt (Kapitel II.10.3). Der Reaktionsprodukte wurden dünnschichtchromatographisch verfolgt. In Abbildung III.26 ist das jeweilige Reaktionsprodukt des GG11 mit Linolsäure, Linolensäure, 10-Undecensäure, Monomethylpimelat und Methyl-5-Bromvalerat in einem Dünnschichtchromatogramm wiedergeben.

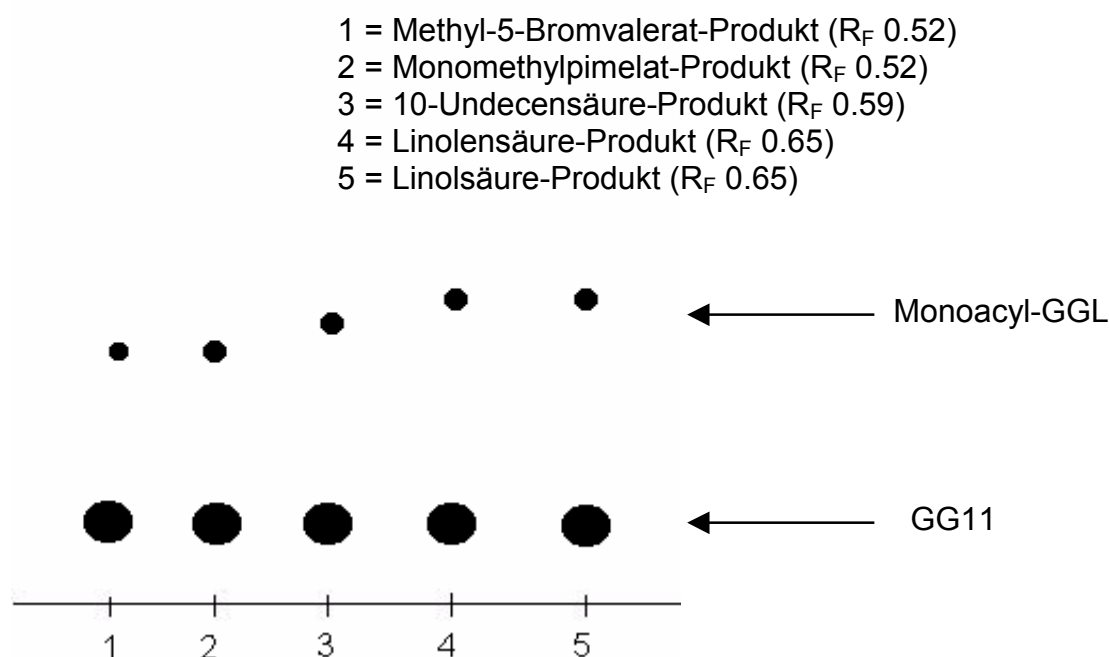


Abbildung III.26: Dünnschichtchromatogramm des Reaktionsverlaufs der enzymatischen Acylierung von GG11 mit verschiedenen Fettsäuren auf NP-Kieselgel; Laufmittelsystem: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (30/15/1) (v/v/v); Detektionsmittel: α -Naphthol. Standardansatz: 0.15 mmol GG11 + 0.45 mmol Fettsäure + 100 mg Novozym Lipase 435 + aktiviertes Molsieb; 20 ml tert-Amylalkohol; 50°C; 48 h; 100 Upm.

Es fanden zwar bei allen 5 eingesetzten Fettsäuren Umsetzungen mit GG11 statt, aber dabei lag das Reaktionsgleichgewicht weit auf der Seite der Edukte (> 90 %). Aufgrund der geringen Ausbeute war es nicht möglich, die jeweiligen Produktpeaks vollständig zu charakterisieren. Die R_F -Werte lassen aber den Rückschluss zu, dass es sich um die jeweiligen monoacylierten Glycoglycerine handeln sollte.

7.4 Darstellung eines neuen Glycoglycerolipids durch enzymatische Acylierung des GG11

Die Umsetzung des Glycoglycerins GG11 mit 4-Pentensäure führte zur Bildung eines neuen Glycoglycerolipids (GGL12). Die enzymatische Acylierung von GG11 wurde im Standardansatz durchgeführt (Kapitel II.10.3). Der Reaktionsverlauf ist in den Abbildungen III.27, III.28 und III.29 aufgeführt.

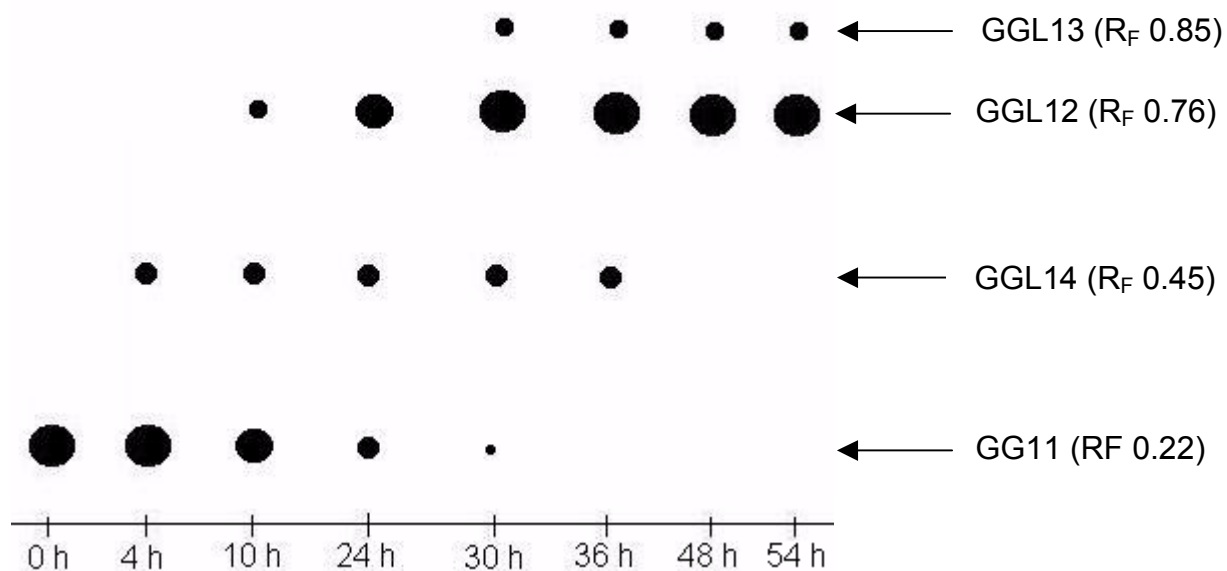


Abbildung III.27: Dünnschichtchromatogramm des Reaktionsverlaufs der enzymatischen Acylierung von GG11 mit 4-Pentensäure auf NP-Kieselgel; Laufmittelsystem: CHCl₃/MeOH/H₂O (30/15/1) (v/v/v); Detektionsmittel: α -Naphthol. Standardansatz: 0.15 mmol GG11 + 0.45 mmol Fettsäure + 100 mg Novozym Lipase 435 + aktiviertes Molsieb; 20 ml tert-Amylalkohol; 50°C; 54 h; 100 Upm.

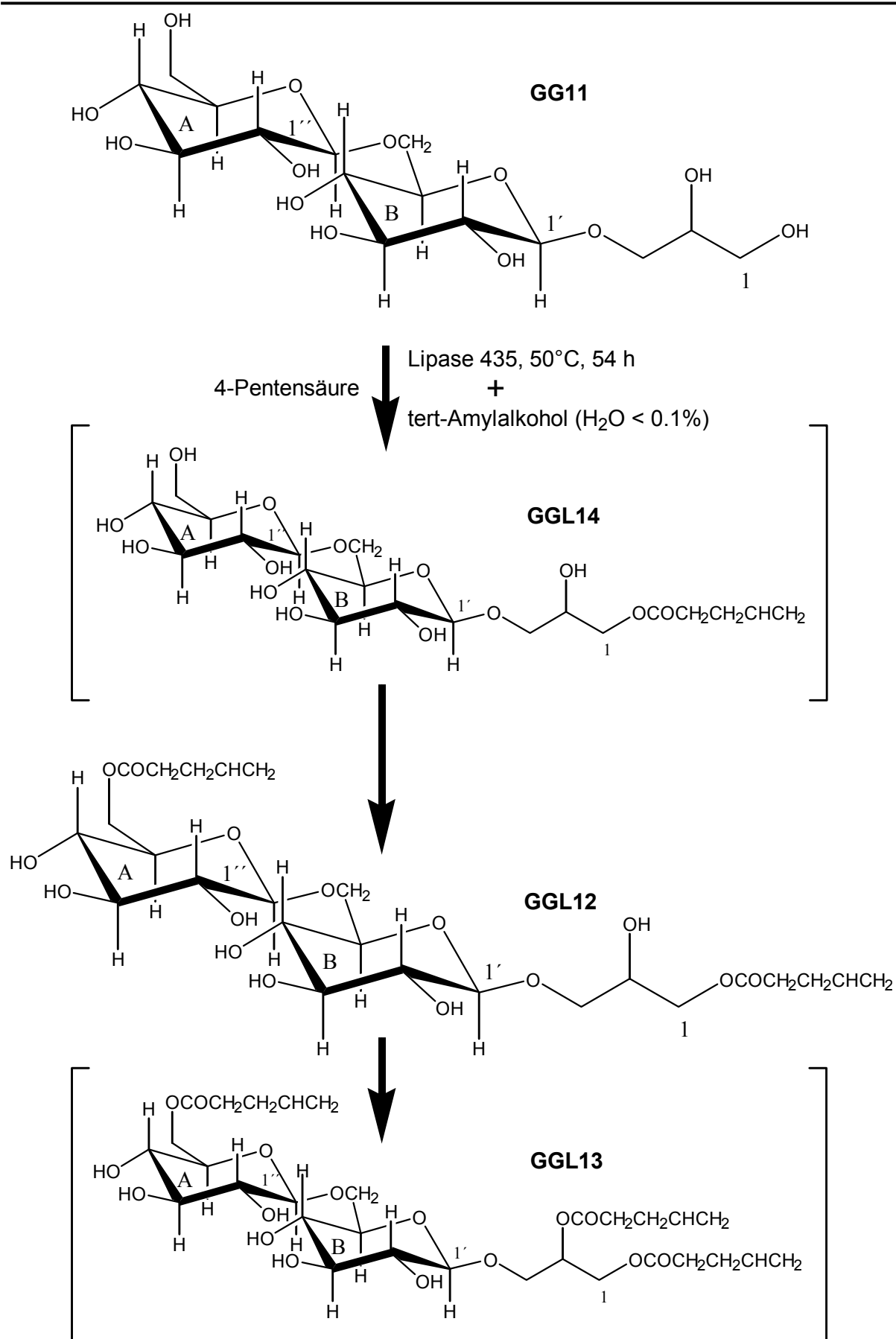


Abbildung III.28: Enzymatische Acylierung von GG11 mit 4-Pentensäure. Die Strukturnachweise von GGL13 und GGL14 wurden nicht geführt. Die R_F -Werte legen diese Strukturen nahe.

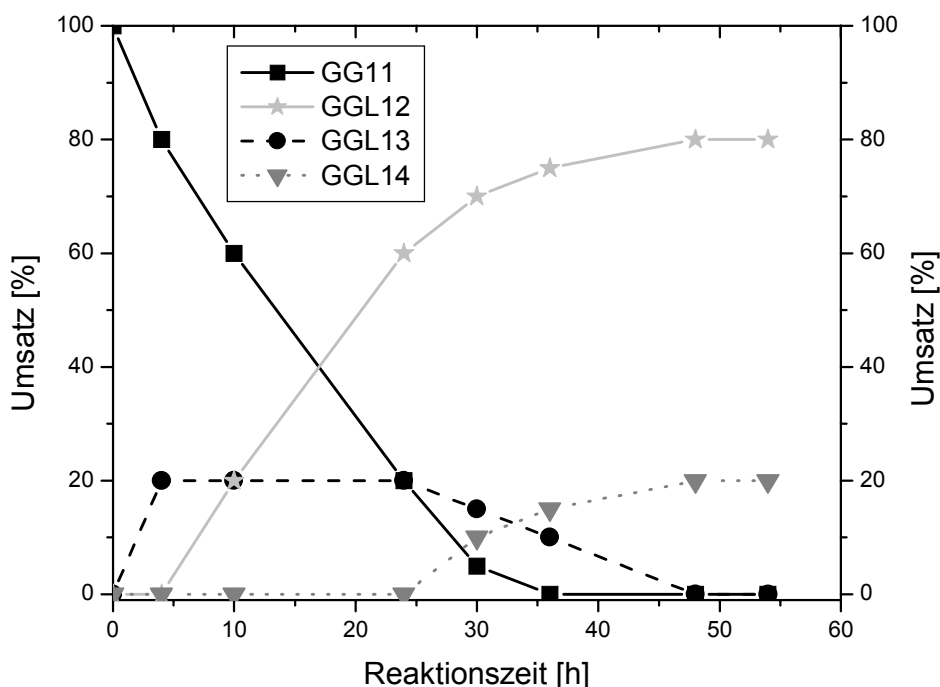


Abbildung III.29: Kinetik der enzymatischen Acylierung von GG11 mit 4-Pentensäure.
Standardansatz: 0.15 mmol GG11 + 0.45 mmol Fettsäure + 100 mg Novozym Lipase 435 + aktiviertes Molsieb; 20 ml tert-Amylalkohol; 50°C; 54 h; 100 Upm.

Das Glycoglycerin GG11 wurde in der enzymatischen Acylierung vollständig umgesetzt. Bereits nach 4 h waren geringe Mengen an GGL14 vorhanden. Aber aus dem weiteren Reaktionsverlauf wird erkennbar, dass, sobald GGL14 vorhanden war, dieses Molekül sofort zum GGL12 weiter acyliert wurde. Nach 48 h war das Reaktionsgleichgewicht erreicht. Das Hauptprodukt war das Glycoglycerolipid GGL12 (80 %). Das Nebenprodukt GGL13 wurde zu 20 % gebildet. Die Tabellen VII.2, VII.5 und VII.7 (Anhang) enthalten die NMR-spektroskopischen und massenspektrometrischen Daten von GGL12. Das ^{13}C NMR Spektrum zeigte 21 Signale mit den Multiplizitäten (DEPT-135 Spektrum) und charakteristischen chemischen Verschiebungen, die mit einer Disaccharideinheit, einem Glycerinrest und zwei 4-Pentensäureresten übereinstimmen. Aufgrund der charakteristischen Tieffeld Verschiebung des C-6' (69.5 ppm) im Vergleich zum freien C-6'' (64.1 ppm) besteht das Disaccharid aus zwei 1''- 6' β -glycosidisch miteinander verknüpften Zuckern. Deren Identifizierung erfolgte über die H(1-2) Kopplungskonstante, die für die Glucose charakteristische 7.7 Hz betrug. Die Positionen der 4-Pentensäure im Molekül konnten anhand der long range ^{13}C - ^1H Verschiebungskorrelationen (HMBC Spektrum) bestimmt werden. Dabei wurden Kreuzpeaks zwischen H-1 und C-1'''

bzw. H-6''B und C-1'''' beobachtet. Die Kreuzpeaks zwischen H-1' und C-3 bzw. H-3 und C-1' belegten die Bindung zwischen der Disaccharideinheit mit dem Glycerinrest.

Die Strukturen von GGL13 und GGL14 wurden anhand ihrer R_F -Werte bestimmt, da GGL13 ein Nebenprodukt ist, das nur in sehr geringen Mengen gebildet wird und GGL14 ein Intermediat, das sofort zu GGL12 weiterreagiert. Der Unterschied zwischen den Glycoglycerolipiden GGL12, GGL13 und GGL14 ist der Acylierungsgrad des Glycoglycerolipids. GGL12 ist zweifach acyliert und zwar mit der 4-Pentensäure an den Positionen C1 und C''6. Dagegen sind GGL13 dreifach (C1, C2 und C''6) und GGL14 einfach acyliert (C1).

Anschließend wurde der Einfluss der Temperatur auf das Reaktionsgleichgewicht der enzymatischen Acylierung von GG11 mit 4-Pentensäure untersucht. Das Temperaturprofil ist in Abbildung III.30 dargestellt.

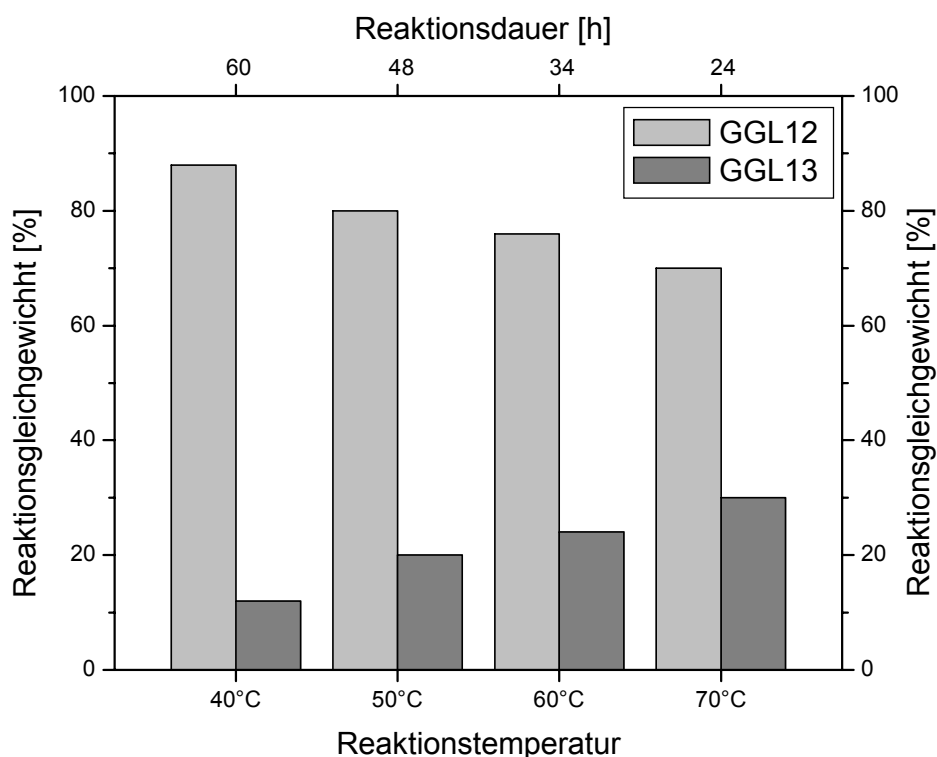


Abbildung III.30: Temperaturprofil der enzymatischen Acylierung von GG11 mit 4-Pentensäure. Bedingungen: 2 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße; 1 mg GG11 + 5 mg 4-Pentensäure + 5 mg Novozym Lipase 435 + aktiviertes Molsieb; 1.5 ml tert-Amylalkohol; 24 - 60 h; 100 Upm.

Mit Abnahme der Temperatur verschob sich das Reaktionsgleichgewicht der enzymatischen Acylierung von GG11 mit 4-Pentensäure in Richtung GGL12 bei gleichzeitiger Verlängerung der Reaktionsdauer. Das Reaktionsgleichgewicht zwischen GGL12 und GGL13 betrug bei 70°C und nach 24 h 70/30, um dann kontinuierlich bis auf 88/12 bei 40°C und nach 72 h anzusteigen. Bei allen Temperaturen wurde das GG11 zu 100 % umgesetzt und auch das Zwischenprodukt GGL14 sofort weiter zum GGL12 acyliert.

Zusammenfassung

Durch enzymatische Modifikationen konnten aus GGL11 die neuartigen Glycoglycerolipide GGL11a, GGL12, GGL13 und GGL14 bzw. das Glycoglycerin GG11 dargestellt werden. Bei der enzymatischen Hydrolyse [Lösungsmittel: tert-Amylalkohol (Wassergehalt < 1 %); Temperatur: 55°C] des GGL11 zu GG11 konnte die Produktbildung über die Reaktionszeit gesteuert werden. Die Hydrolyse zu GG11 verlief in zwei Stufen. Bereits nach 10 h war die Bildung des Zwischenprodukts GGL11a zu erkennen. Daraufhin setzte die Umsetzung des GGL11a zu GG11 ein (24 h). Nach 48 h war kein GGL11a mehr nachweisbar. Die Ausbeute an GG11 betrug 84 %.

Bei der enzymatischen Acylierung [Lösungsmittel: tert-Amylalkohol (Wassergehalt < 0.1 %) Temperatur: 40°C] des GG11 mit 4-Pentensäure wurde das Hauptprodukt GGL12 (zweifach acyliertes Glycoglycerolipid) und das Nebenprodukt GGL13 (dreifach acyliert) und das Zwischenprodukt GGL14 (einfach acyliert) gebildet. Die Ausbeute an GGL12 betrug 88 %.

8. Physiko-chemische Eigenschaften der Glycoglycerolipide GGL11 und GGL12

Da es sich bei den Glycoglycerolipiden GGL11 und GGL12 um Moleküle mit amphiphilem Charakter handelt, wurden verschiedene physiko-chemische Untersuchungen bezüglich einer möglichen Verwendung als Biotensid durchgeführt.

8.1 Oberflächen- und Grenzflächenspannung

An der Oberfläche einer Flüssigkeitsphase werden die Kohäsionskräfte, die die Teilchen in der kondensierten Phase zusammenhalten, anisotrop. Die daraus resultierende Zugspannung wird als Oberflächen- (Grenzgebiet kondensierte Phase/Gasoberfläche) oder Grenzflächenspannung (Berührungsbereich zweier kondensierter Phasen) bezeichnet. Infolge dieser Kraft versuchen Flüssigkeiten eine bei vorgegebenen Volumen minimale Oberfläche, d.h. Kugelgestalt anzunehmen. Bringt man oberflächenaktive Substanzen in die Flüssigkeit ein, so werden die intermolekularen Wechselwirkungen beeinflusst und es kommt zu einer Erniedrigung der Ober- oder Grenzflächenspannung.

In Abbildung III.31 sind die Oberflächenspannungen wässriger Lösungen von GGL11 und GGL12 in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration halblogarithmisch dargestellt. Die experimentellen Daten zeigen, dass das Glycoglycerolipid GGL11 die deutlich besseren Grenzflächeneigenschaften zeigte. GGL11 reduzierte die Oberflächenspannung von 72 mN/m auf 29 mN/m und der dazugehörige CMC-Wert lag bei 50 mg/l (Tabelle III.14). Die minimal erreichbare Oberflächenspannung von GGL12 betrug 40 mN/m. Dies entsprach einem CMC-Wert von 250 mg/l.

Tabelle III.14: CMC-Werte der verschiedenen Glycoglycerolipide.

| | Molekulargewicht | CMC [mg/l] | CMC [mol/l] |
|--------------|------------------|------------|---------------------|
| GGL11 | 864 g/mol | 50 | $5.8 \cdot 10^{-5}$ |
| GGL12 | 580 g/mol | 250 | $4.3 \cdot 10^{-4}$ |

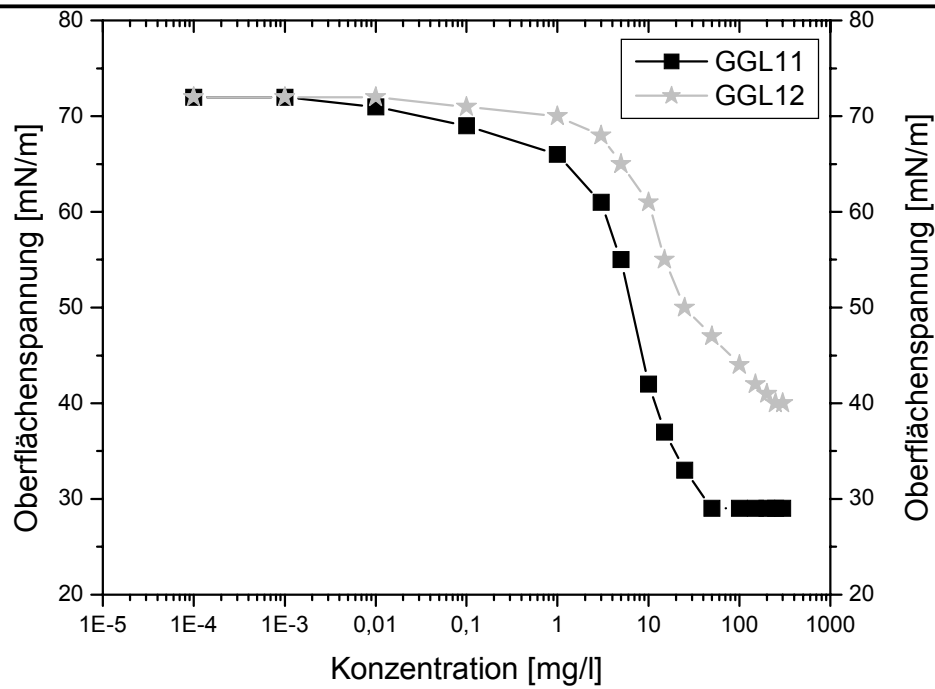


Abbildung III.31: Einfluss der Glycoglycerolipide GGL11 und GGL12 auf die Oberflächenspannung von dest. H₂O bei 25°C.

Die minimalen Grenzflächenspannungen (Abb. III.32) des Systems H₂O/n-C₁₆ in Gegenwart der Glycoglycerolipide lagen bei 5 mN/m (GGL11) bzw. 19 mN/m (GGL12).

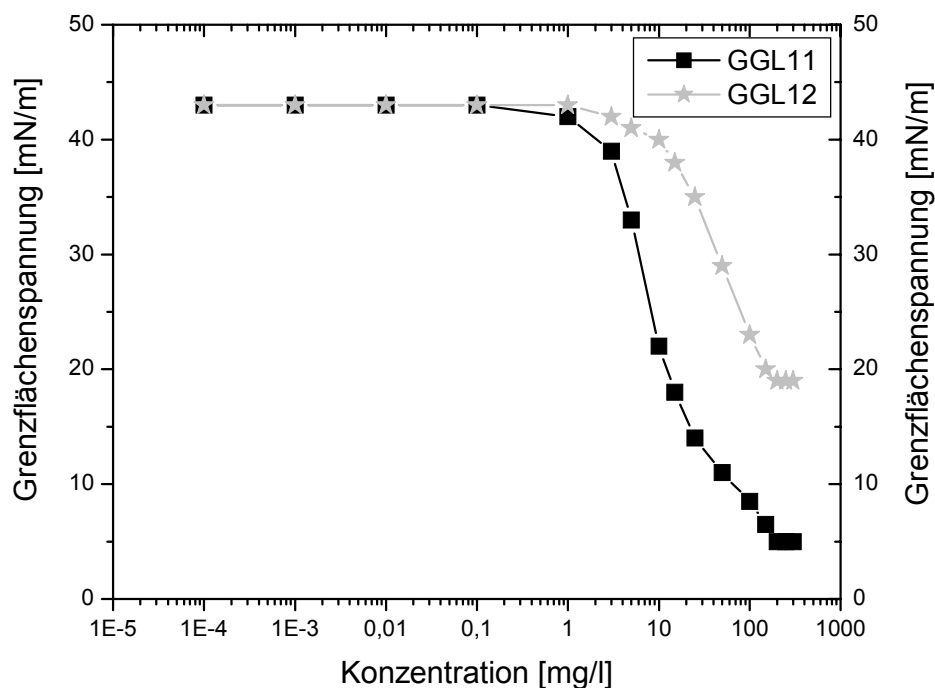


Abbildung III.32: Einfluss der Glycoglycerolipide GGL11 und GGL12 auf die Grenzflächenspannung zwischen dest. H₂O und n-Hexadecan bei 25°C.

8.2 Spreitung

Der Spreitungsdruck einer Flüssigkeit ist ein Maß für das Bestreben der Moleküle, an einer Flüssigkeitsoberfläche ihre Volumenphase zu verlassen und sich auszubreiten. Das Spreitungsvermögen spielt eine wichtige Rolle bei der Herstellung von Zubereitungen für äußere Anwendungen z.B. von Cremes, deren Wirkstoffe sich selbständig und gleichmäßig auf der Haut verteilen sollen. Die Ergebnisse der durchgeführten Messungen sind in Abbildung III.33 dargestellt. Die beiden Glycoglycerolipide spreiteten spontan auf der Wasseroberfläche, wobei sie einen ähnlichen Verlauf zeigten. GGL11 benötigte für die Spreitung einen Zeitraum von ca. 30 Sekunden. Im Vergleich dazu verlief die Spreitung bei GGL12 langsamer (ca. 50 Sekunden). Die erreichten Oberflächenspannungswerte entsprachen weitestgehend den nach der Ringmethode bestimmten minimal erreichbaren Oberflächenspannungen in wässriger Lösung.

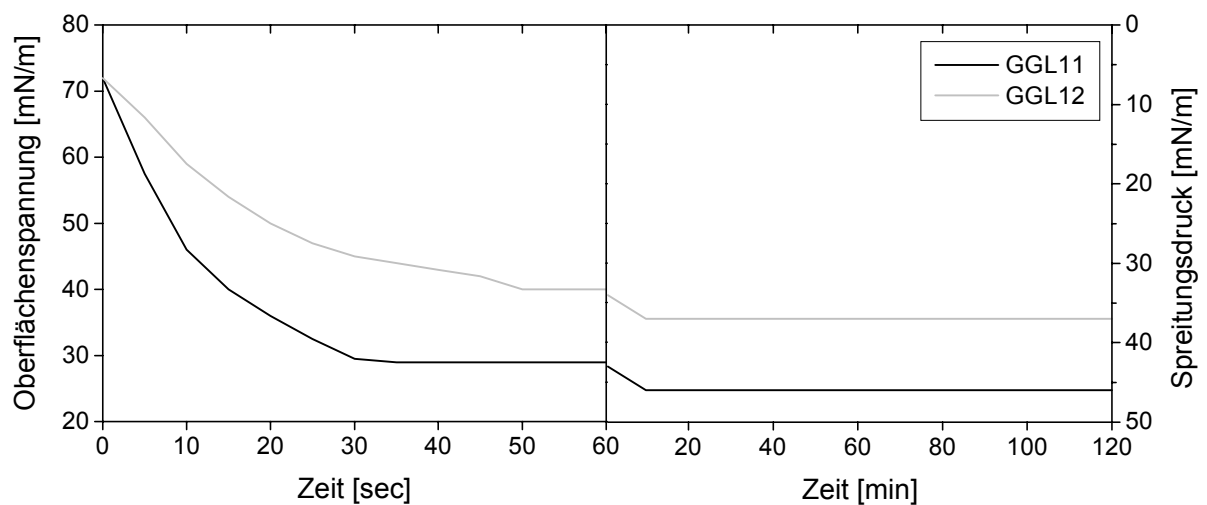


Abbildung III.33: Spreitungsverhalten von GGL11 und GGL12 auf dest. H₂O bei 25°C.

8.3 Emulsionstests

Emulsionen sind Zweistoffsysteme, bestehend aus einer meist im Überschuss vorhandenen kontinuierlichen oder äußeren Phase und einer in dieser äußeren Phase dispergierten Flüssigkeit. Je nachdem welche Phase als kontinuierliche Phase vorliegt, unterscheidet man Wasser in Öl und Öl in Wasser Emulsionen.

Der HLB-Wert, der das hydrophile-lipophile Gleichgewicht in einem Molekül beschreibt, wurde für die Glycoglycerolipide GGL11 und GGL12 experimentell mit einem System aus Sojaöl (HLB 6) und Cyclohexan (HLB 15) bestimmt. Der HLB-Wert, bei dem das eingesetzte Substratgemisch am besten emulgiert wurde, entsprach dem HLB-Wert des jeweiligen Biotensids. In Abbildung III.34 sind die HLB-Werte für GGL11 und GGL12 dargestellt.

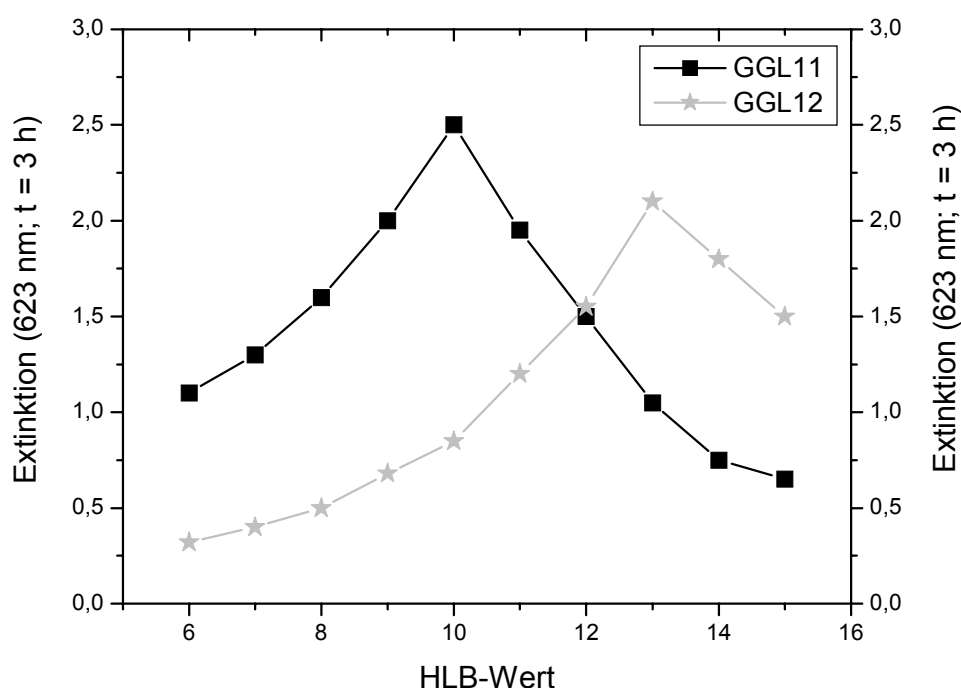


Abbildung III.34: Experimentelle Bestimmung der HLB-Werte von GGL11 und GGL12.
Bedingungen: 0.5 mg/ml Emulgator; 2.5 % hydrophobe Phase; 4 ml Wasser; 3 h.

Für beide Glycoglycerolipide ergab sich der typische Verlauf einer Glockenkurve. Dabei wurde eine maximale Emulgatoraktivität (als Extinktion) für GGL11 von 2.5 und für GGL12 von 2.3 erreicht. Diese entsprachen den erforderlichen HLB-Werten von 10 (GGL11) bzw. 13 (GGL12).

Abbildung III.35 zeigt die Emulsionsstabilität in Abhängigkeit von der Emulgatorkonzentration. Dabei wurde jeweils die vorher ermittelte für die beiden Glycoglycerolipide optimale Substratmischung emulgiert. Für GGL11 wurde die Sättigung bei einer Konzentration von 0.3 mg/ml erreicht. Dagegen zeigte GGL12 bei einer Konzentration von 0.4 mg/ml die maximale Emulgatorwirkung. Höhere Emulgatorwirkungen konnte auch bei weiterer Konzentrationssteigerung der Glycoglycerolipide nicht erreicht werden.

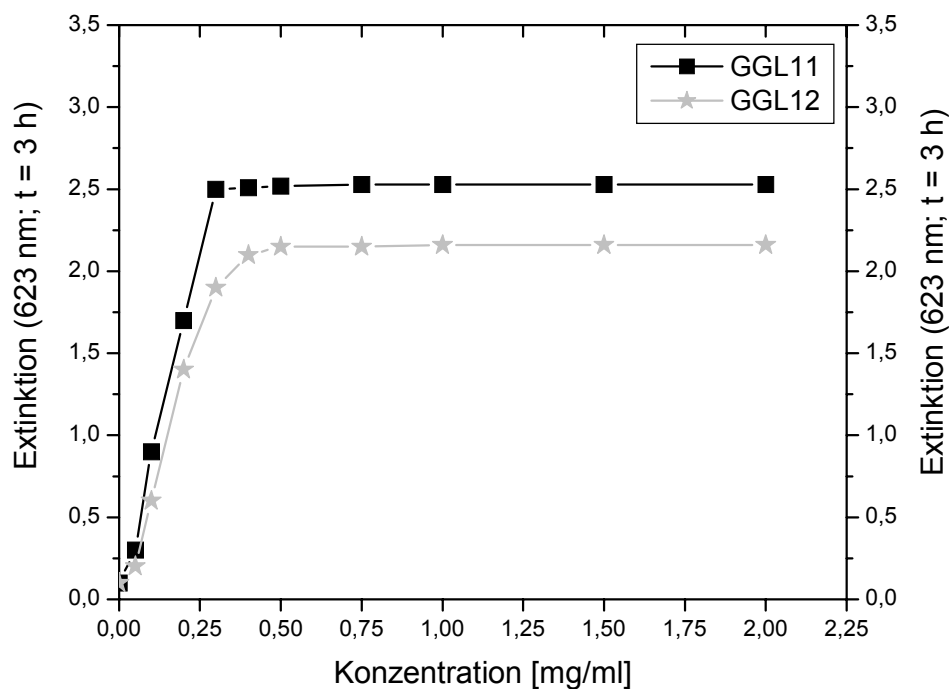


Abbildung III.35: Abhängigkeit der Emulgatoraktivität von der Konzentration der Glycoglycerolipide. Bedingungen: Hydrophobe Phase ist das in Abbildung III.34 ermittelte optimale Gemisch; 3 h.

Die Abbildungen III.36 und III.37 zeigen exemplarisch am Beispiel von GGL11 die Emulgation verschiedener Öle und Wasser als Ö/W- bzw. als W/Ö-Emulsion. Die eingesetzte Tensidkonzentration betrug 0.5 mg/ml. Als hydrophobe Phase wurden n-Hexadecan, Kerosin und Mineralöl eingesetzt. Durch den Einsatz eines 40-fachen Überschusses der äußeren Phase wurden die jeweiligen Ö/W- und W/Ö-Emulsionen erzwungen. Analog dem bereits bestimmten HLB-Wert von 10 verhielten sich Ö/W-Emulsionen ähnlich stabil wie W/Ö-Emulsionen. Sowohl in W/Ö- als auch in Ö/W-Emulsionen wurde jeweils das Mineralöl optimal emulgiert.

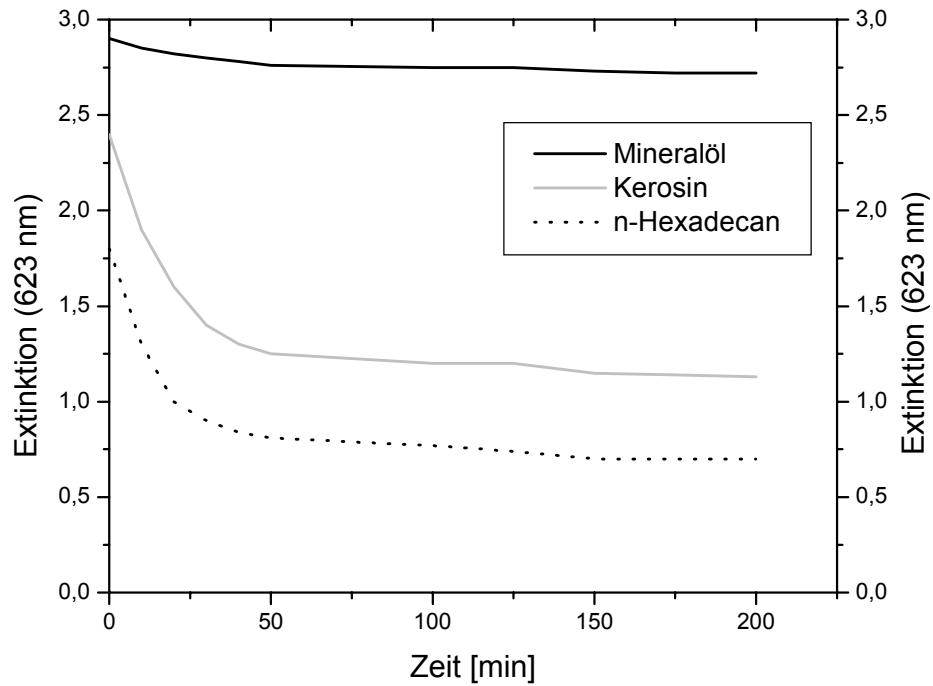


Abbildung III.36: Emulsionsstabilität von Ö/W-Emulsionen.
Bedingungen: GGL11 (0.5 mg/ml) als Emulgator; Hydrophobe Phase: n-Hexadecan, Kerosin und Mineralöl; 40facher Überschuss der äußeren Phase.

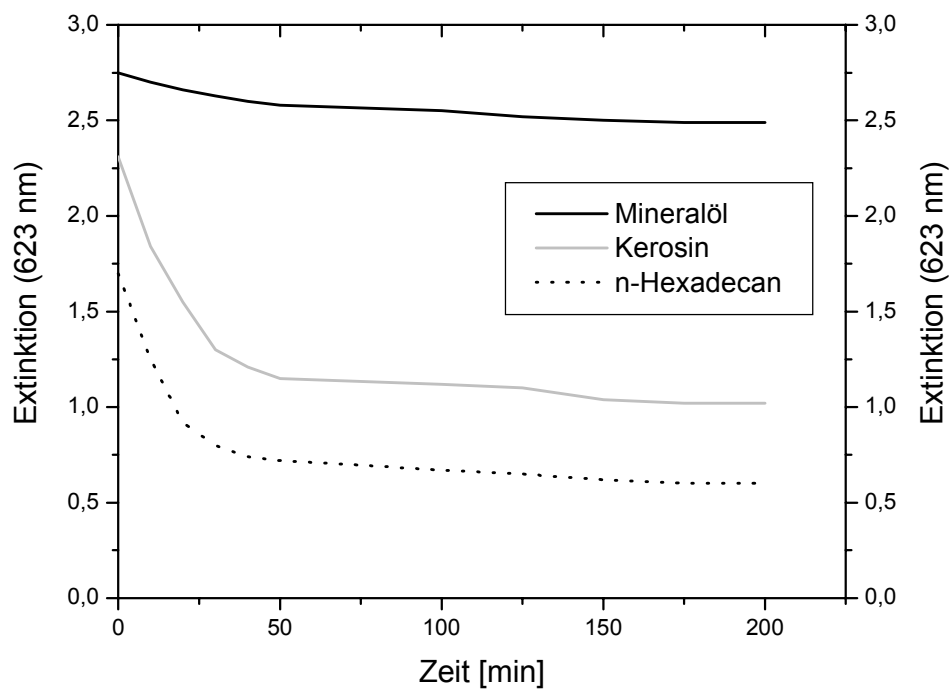


Abbildung III.37: Emulsionsstabilität von W/Ö-Emulsionen.
Bedingungen: GGL11 (0.5 mg/ml) als Emulgator; Hydrophobe Phase: n-Hexadecan, Kerosin und Mineralöl; 40facher Überschuss der äußeren Phase.

Zusammenfassung

Physiko-chemische Untersuchungen von GGL11 und GGL12 zeigten, dass die Glycoglycerolipide gute oberflächen- und grenzflächenaktive Eigenschaften besitzen. Die Oberflächenspannung von Wasser wurde von 72 mN/m auf 29 mN/m (GGL11) bzw. auf 40 mN/m (GGL12) erniedrigt und die CMC-Werte betrugen für GGL11 50 mg/l bzw. für GGL12 250 mg/l. Die Grenzflächenspannung von Wasser/Hexadecan konnte bis auf 5 mN/m (GGL11) bzw. auf 19 mN/m (GGL12) abgesenkt werden. Die beiden Glycoglycerolipide spreiteten spontan auf der Wasseroberfläche, wobei sie einen ähnlichen Verlauf zeigten. GGL11 benötigte für die Spreitung einen Zeitraum von ca. 30 Sekunden. Im Vergleich dazu verlief die Spreitung bei GGL12 langsamer (ca. 50 Sekunden). Die experimentell bestimmten HLB-Werte betrugen 10 (GGL11) bzw. 13 (GGL12). GGL11 stabilisiert sowohl Ö/W-Emulsionen als auch W/Ö-Emulsionen. In beiden Fällen wurde das Mineralöl optimal emulgiert.

9. Biologische Aktivität

Eine der Aufgaben dieser Arbeit war die Suche nach neuen biologisch aktiven Naturstoffen. Daher wurden die dargestellten Glycoglycerolipide GGL11, GGL11a und GGL12 und das Glycoglycerin GG11 verschiedenen medizinisch relevanten Tests unterzogen.

9.1 Antimikrobielle Eigenschaften

Die toxische Wirkung gegen Bakterien, Pilze und Algen lässt sich *in vitro* leicht bestimmen. Hierzu wurde die Hemmung oder Abtötung der Testorganismen über einen qualitativen Agardiffusionstest verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle III.15 dargestellt.

Tabelle III.15: Antimikrobielle Wirkung der Reinsubstanzen GGL11, GGL11a, GGL12 und GG11 gegenüber verschiedenen Testorganismen im Agardiffusionstest.

| Probe (500 µg) | Hemmwirkung Durchmesser [mm] | | | |
|---------------------------------|---------------------------------|--------|-------|------|
| | GGL11 | GGL11a | GGL12 | GG11 |
| Bakterien: | | | | |
| <i>Bacillus megaterium</i> | - | - | - | 11 |
| <i>Escherichia coli</i> | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | - | - | - | - |
| Alge: | | | | |
| <i>Chlorella fusca</i> | - | - | - | - |
| Pilze: | | | | |
| <i>Mycothypha microspora</i> | - | - | - | - |
| <i>Fusarium oxisporium</i> | - | - | - | - |
| <i>Ustilago violacea</i> | - | - | - | 10 |
| <i>Eurotium repens</i> | - | - | - | - |
| <i>Cladosporium cucumerinum</i> | - | - | - | - |

Das Glycoglycerin GG11 zeigte inhibierende Wirkung bei *Bacillus megaterium* (Hemmhofdurchmesser = 11 mm). Die pathogenen Stämme *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* wurden jedoch nicht gehemmt. Gegenüber dem Pilz *Ustilago violacea* bestand eine wachstumshemmende Wirkung (10 mm). Keines der Glycoglycerolipide zeigte antimikrobielle Eigenschaften. Um die beobachteten antibakteriellen und fungiziden Wirkungen zu quantifizieren, wurde das Glycoglycerin GG11 im Bouillon-Dilutionstest (DIN 58940, Teil 5) eingesetzt. Tabelle III.16 zeigt die ermittelten MHK- und IC₅₀-Werte.

Tabelle III.16: MHK- und IC₅₀-Werte von GG11

| Substanz | Testorganismus | MHK-Wert [µg/ml] | IC ₅₀ -Wert [µg/ml] |
|----------|----------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| GG11 | <i>Bacillus megaterium</i> | 425 | 100 |
| | <i>Ustilago violacea</i> | 500 | 150 |

Mit einem IC₅₀-Wert von 100 µg/ml zeigte das GG11 die stärkste Wirkung gegenüber *Bacillus megaterium*. Etwas schwächer wirksam war das Glycoglycerin mit einem IC₅₀-Wert von 150 µg/ml gegenüber *Ustilago violacea*. Die gleiche Tendenz war auch bei den MHK-Werten zu erkennen. Wiederum war die Wirkung des Glycoglycerins auf *Bacillus megaterium* (425 µg/ml) größer als auf *Ustilago violacea* (500 µg/ml).

9.2 Pharmakologische Assays

Im Hinblick auf pharmazeutische Applikationen wurden das Glycoglycerin GG11 und die Glycoglycerolipide GGL11, GGL11a und GGL12 an verschiedene auswärtige Institute und Firmen weitergegeben (Kapitel II.11.6). Die Tabellen III.17 und III.18 fassen die erhaltenen Ergebnisse zusammen.

Am Institut für Molekulare Medizin und Naturstoffforschung (KTB Tumorforschungs GmbH, Freiburg) wurden die dargestellten Reinsubstanzen auf Hemmung bzw.

Aktivierung einer Reihe von Proteinkinasen, die an der Entstehung und Entwicklung von Tumoren beteiligt sind, getestet. Keine der getesteten Proben zeigte nennenswerte Aktivitäten.

In Zytotoxizitätstests zeigten die Substanzen GGL11a und GG11 gegen die Tumorzelllinien HM02 (Magencarcinom) und HEP-G2 (Lebercarcinom) deutliche Wirkungen. Die wirksamen Konzentrationen waren für GGL11a die GI_{50} -Werte 0.21 $\mu\text{g/ml}$ (HM02) bzw. 1.5 $\mu\text{g/ml}$ (HEP-G2) und für GG11 0.9 $\mu\text{g/ml}$ (HM02) bzw. 1.4 $\mu\text{g/ml}$ (HEP-G2). Bei diesem zytotoxischen Testsystem wird die Zellzahl mit dem Proteinreagenz Sulforhodamin [Shekan et al., 1990] bestimmt. Dagegen konnte im MTT- Zytotoxizitätstest gegen die Tumorzelllinie L 5178Y keine Aktivität beobachtet werden ($GI_{50} > 10 \mu\text{g/ml}$).

Auch im Neuroprotektionstest konnte keine Aktivität festgestellt werden. Dabei wird die Fähigkeit von Molekülen, die als NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Kanalblocker wirken, mittels einem funktionellen [^3H]-(+)-MK-801 Binding Assay festgestellt. Die inhibierende Wirkung der getesteten Substanz wird in Relation zu dem Substrat MK-801 angegeben.

Deutliche antitumorale Wirkungen der eingesetzten Substanzen konnten im Test auf Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch die Inhibierung der durch 12-O-Tetradecanoyl-phorbol-13-acetat (TPA) induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des *Epstein-Barr-Virus* (EBV-EA) beobachtet werden. Die höchste antitumorale Aktivität wies das Glycoglycerin GG11 auf. Schon bei der geringsten Konzentration (10facher molarer Überschuss an GG11) war eine Anti-Tumor-Promoting-Aktivität von 91.7 % festzustellen. Die getesteten Glycoglycerolipide hemmten dagegen erst bei deutlich höheren Konzentrationen. Bei einem 1000fachen Überschuss an GG11 war nahezu keine Virusaktivität mehr nachzuweisen (2.5 %). Gleichzeitig wiesen alle eingesetzten Substanzen Überlebensraten der Raji-Zellen (EBV-Genom tragende menschliche lymphoblastische Zellen) von 60 bis 80 % auf. Dieser Zusammenhang ist von entscheidender Bedeutung, da für den therapeutischen Einsatz einer Substanz neben der eindeutigen Wirksamkeit auch eine gute Verträglichkeit erforderlich ist.

Tabelle III.17: Zytotoxische und neuroprotektive Wirkung der Reinsubstanzen GGL11, GGL11a, GGL12 und GG11.

| Test | Messgröße | GGL11 | GGL11a | GGL12 | GG11 |
|-------------------------------------------|---------------------------------------|---------|---------|---------|---------|
| Zytotoxizität | | [µg/ml] | [µg/ml] | [µg/ml] | [µg/ml] |
| Tumorzelllinie HM02 (Magencarcinom) | GI ₅₀ | > 10 | 0.21 | > 10 | 0.90 |
| | TGI | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 |
| Tumorzelllinie HEP-G2 (Lebercarcinom) | GI ₅₀ | 7.5 | 1.5 | > 10 | 1.4 |
| | TGI | > 10 | > 10 | > 10 | > 10 |
| Tumorzelllinie L 5178Y | GI ₅₀ | > 10 | - | - | - |
| Neuroprotektion | | [%] | [%] | [%] | [%] |
| [³ H]-MK-801 Binding Assay | [³ H]-MK-801 % Control | 92.7 | - | - | - |

Tabelle III.18: Inhibierung der TPA-induzierten Aktivierung des *Epstein-Barr-Virus Early Antigen* (EBV-EA) durch GGL11, GGL11a, GGL12 und GG11.

| Substanz | Aktivität in % der Kontrollprobe* [mol ratio / TPA] | | | |
|----------|--------------------------------------------------------|------|------|------|
| Substanz | 1000 | 500 | 100 | 10 |
| GGL11 | 16.5 (80)** | 59.7 | 84.1 | 100 |
| GGL11a | 21.3 (60)** | 59.6 | 85.0 | 100 |
| GGL12 | 15.2 (60)** | 51.4 | 79.4 | 100 |
| GG11 | 2.5 (70)** | 38.5 | 74.3 | 91.7 |
| GG*** | 0 (70)** | 20.7 | 62.4 | 82.5 |

* Kontrollprobe TPA 32 pmol = 100 %; ** Überlebensrate der Raji-Zellen; *** 3-O-D-β-Galactopyranosylglycerin [Colombo et al., 1996]

Zusammenfassung

Das Glycoglycerin GG11 zeigte inhibierende Wirkung bei *Bacillus megaterium* (Hemmhofdurchmesser = 11 mm) und dem Pilz *Ustilago violacea* (10 mm). Mit einem IC₅₀-Wert von 100 µg/ml zeigte das GG11 die stärkste Wirkung gegenüber *Bacillus megaterium*. Etwas schwächer wirksam war das Glycoglycerin mit einem IC₅₀-Wert von 150 µg/ml gegenüber *Ustilago violacea*. Die gleiche Tendenz war auch bei den MHK-Werten zu erkennen. Wiederum war die Wirkung des Glycoglycerins auf *Bacillus megaterium* (425 µg/ml) größer als auf *Ustilago violacea* (500 µg/ml). Keines der Glycoglycerolipide zeigte antimikrobielle Eigenschaften. Die dargestellten Verbindungen GGL11a und GG11 zeigten in den Zytotoxizitätstests gegen die Tumorzelllinien HM02 (Magencarcinom) und HEP-G2 (Lebercarcinom) signifikante Aktivitäten. Dabei lag der GI₅₀-Wert für GGL11a bei 0.32 µmol/l (HM02). Außerdem zeigten die Glycoglycerolipide GGL11, GGL11a, GGL12 und das Glycoglycerin GG11 hohe Anti-Tumor-Promoting-Aktivität (Tabelle III.18).

IV Diskussion

Die marine Biosphäre stellt für die Naturstoffforschung eine neue und attraktive Quelle für biologisch aktive Wirkstoffe dar. Aufgrund der extremen ökophysiologischen Variabilität des Meeres zeigen marine Makro- und Mikroorganismen einzigartige metabolische und physiologische Fähigkeiten. Zusätzlich ist das Auffinden neuer Naturstoffquellen unbedingt erforderlich, da einerseits abnehmende Entdeckungsraten von neuartigen Substanzen aus terrestrischen Quellen zu beobachten sind und andererseits die Resistenzen vieler Krankheitserreger gegenüber herkömmlichen Antibiotika stark ansteigt [Fenical, 1993].

Gerade marine Schwämme sind als sessile Lebewesen aufgrund ihrer fehlenden Mobilität zur Bekämpfung von Feinden auf eine wirksame chemische Abwehr angewiesen. Dieser Zusammenhang wird durch die zunehmende Veröffentlichung von neuartigen pharmakologisch wirksamen Metaboliten aus marinen Schwämmen immer deutlicher [Proksch et al., 1996; Fusetani et al., 1993]. Da Schwämme immer in Gemeinschaft mit Mikroorganismen leben, ist eine Beteiligung letzterer an der Produktion von bioaktiven Metaboliten nicht auszuschließen. Bei einigen aus Schwammproben isolierten bioaktiven Metaboliten konnte nachgewiesen werden, dass diese auch von mit dem Schwamm assoziierten Mikroorganismen produziert wurden [Bewley and Faulkner, 1998; Stierle et al., 1988]. Daher erscheint es vielversprechend, marine Mikroorganismen aus Schwämmen zu isolieren und sie auf eine mögliche Produktion an bioaktiven Naturstoffen zu untersuchen. Zugleich gestaltet sich die Kultivierung von Bakterien viel einfacher, schneller und damit effektiver als bei den Schwämmen. Dort steht die Forschung erst am Anfang und erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Fermentation von Schwammzellen in Gewebekulturen nur sehr schwierig zu erreichen sein wird [Faulkner, 2000b; Osinga et al., 1998].

Von den marinen Schwämmen der Gattung *Acanthella* ist bekannt, dass sie bioaktive Metabolite bilden. Beispielsweise produziert *Acanthella cavernosa* die Diterpenoide Kalihinol A, das eine hohe Antimalaria-Aktivität (EC_{50} -Wert = $1.2 \cdot 10^{-9}$ M) besitzt [Miyaoka et al., 1998] und die Kalihinene X, Y und Z, die die Besiedlung und

Metamorphose der Larven des Krebses *Balanus amphitrite* (anti-fouling) inhibieren [Fusetani et al., 1996]. Der Schwamm *Acanthella carteri* produziert das bioaktive Alkaloid Hanishin, das das Wachstum der humanen Lungenkrebszelllinie NSCLC-N6 inhibiert (IC_{50} -Wert = 9.7 $\mu\text{g/ml}$) [Mancini et al., 1997]. Diese Schwämme standen für eigene Arbeiten nicht zur Verfügung. Daher wurde der aus der Ägäis geerntete Schwamm *Acanthella acuta* auf assoziierte Bakterien untersucht.

1. Screening

Die Suche nach neuen pharmakologisch wirksamen marinen Naturstoffen beginnt mit der Sammlung der marinen Organismen. Dies ist häufig der wichtigste Schritt im gesamten Forschungsprogramm, weil die Qualität der ausgesuchten Organismen über den zukünftigen Erfolg dieser Forschungen entscheidet. Dabei müssen die Taucher Habitate finden, die eine ausgewogene Mischung aus biologischer Diversität und Dichte gewährleisten. Anschließend muss die Sammlung genau sortiert und sorgfältig dokumentiert werden, so dass die einzelnen Exemplare in Zukunft wiedergefunden werden können. Nachdem ein kleiner Teil der Probe für taxonomische Bestimmungen zur Seite gelegt wird, muss die restliche Probe entweder sofort eingefroren oder in einem geeigneten Lösemittel eingelegt werden, um die sonst unweigerlich einsetzende bakterielle Zersetzung zu verhindern. Nun werden Rohextrakte für das biologische und chemische Screening angefertigt. An diesem Punkt bieten sich zwei Strategien an. Einerseits können die Rohextrakte an viele verschiedene private und öffentliche Forschungseinrichtungen gesendet werden, um eine vorhandene Bioaktivität zu erfassen. Diese Strategie beansprucht nur einen geringen Zeitaufwand, aber die gewonnenen Ergebnisse müssen sorgfältig interpretiert werden, da sich die Wirkungen von Substanzgemischen gegenseitig verstärken oder aufheben können. Außerdem sind nicht alle Bioassays für Rohextrakte ausgelegt. Andererseits können Reinsubstanzen auf der Basis interessanter chemischer Strukturen isoliert und verschiedenen Forschungsgruppen in Industrie und staatlichen Einrichtungen zur Verfügung gestellt werden. Diese Strategie ist zwar zeitraubend, aber die Ergebnisse sind eindeutig und der Anzahl der durchführbaren Bioassays keine Grenzen gesetzt [Faulkner, 2000b].

In dieser Arbeit wurden Bakterien aus dem Schwamm *Acanthella acuta* isoliert und im Primärscreening eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Wasserprobe aus der unmittelbaren Umgebung des Schwammes unter gleichen Bedingungen ebenfalls auf Bakterien untersucht und die Ergebnisse miteinander verglichen. Eine Zusammenfassung und Gegenüberstellung mit Literaturdaten enthält Tabelle IV.1.

Tabelle IV.1: Anzahl mikrobieller Isolate aus Meerwasser- und Invertebratenproben.

| Probe | Anzahl | Grampositiv | Gramnegativ | Andere |
|-----------------------------------------|--------|-------------|-------------|--------|
| <i>Acanthella acuta</i> (Ägäis) | 12 | 6 | 6 | - |
| Meerwasser (Ägäis) | 4 | - | 4 | - |
| <i>Halichondria panicea</i> (Adria)* | 15 | 8 | 7 | - |
| Meerwasser (Adria)* | 7 | 3 | 4 | - |
| Invertebraten (Fiji)** | 304 | 56 | 202 | 46 |
| Meerwasser (Fiji)** | 138 | 32 | 99 | 7 |

* [Wicke, 1999]; ** [Bernan et al., 1997]

Etwa 80 bis 95 % aller kultivierbaren marinen Mikroorganismen sind gramnegativ [De Vries et al., 1994]. In dem Schwamm *Acanthella acuta* verteilt sich die Bakterienpopulation zu 50 % auf gramnegative und zu 50 % auf grampositive Mikroorganismen. Eine ähnliche Verteilung weist auch der Schwamm *Halichondria panicea* auf [Wicke, 1999]. Eine repräsentative Stichprobe von Bernan et al. [1997] ergibt ein Verhältnis von 75 % (gramnegativ) zu 25 % (grampositiv). Auch in dieser Untersuchung wird der von De Vries angegebene untere Wert von 80 % nicht erreicht. Diese Abweichung kann mit der Beobachtung erklärt werden, dass der Anteil grampositiver Bakterien in nährstoffreicheren Habitaten gewöhnlich zunimmt [Fenical, 1993]. Da Invertebrate nährstoffreiche Habitate sind, stellen sie für

grampositive Bakterien eine bevorzugte Umgebung dar. Dafür spricht auch, dass in der nährstoffärmeren Meerwasserprobe (Ägäis) kein grampositives Bakterium isoliert werden konnte.

Zusätzlich konnten Barnan et al. zeigen, dass 57 % der Mikroorganismen aus Invertebraten unbekannt waren und alle Isolate aus der Meerwasserprobe bekannten Spezies zugeordnet werden konnten. Aus dem Schwamm *Acanthella acuta* konnten 33 % und aus der Meerwasserprobe 75 % der mikrobiellen Isolate in eine Gruppe von mehreren möglichen Stämmen eingordnet werden, die mit *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* und *Vibrio* denen mit am häufigsten vorkommenden Gattungen in marinen Habitaten entsprachen [Ferguson et al., 1984]. Diese Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass unbekannte Mikroorganismen aus Invertebraten als Quelle für neue Naturstoffe geeignet erscheinen.

Die Zell- und Überstandsextrakte aller 16 Bakterienisolate wurden im biologischen Screening auf antibakterielle, fungizide, algizide und toxische Aktivitäten getestet. Dabei wurde der Agardiffusionstest in Kombination mit dem DC-Overlay-Test verwendet. Diese Vorgehensweise stellt eine gute Basis für eine anschließende Strukturisolierung dar. Außerdem ermöglichen diese kostengünstigen Tests aufgrund einfacher Handhabung schnelle Ergebnisse. Bei 5 Isolaten konnten Hemmwirkungen beobachtet werden. Dabei zeigten alle Überstandsextrakte der aktiven Isolate antimikrobielle Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien (*Bacillus megaterium*). Außerdem wurden auch Aktivitäten gegen das Wachstum der Alge *Chlorella fusca* und des Pilzes *Ustilago violacea* detektiert. Eine Inhibierung von *Escherichia coli* konnte einmal nachgewiesen werden. Insgesamt zeigten nur zwei Zellextrakte antimikrobielle Wirkung. Diese Beobachtung deckt sich mit den Literaturveröffentlichungen. Danach liegen die meisten bioaktiven Metabolite extrazellulär vor und hemmen das Wachstum von grampositiven Bakterien [Jiang et al., 1997; Jayatilake et al., 1996]. Mit den Rohextrakten aller 5 im Agardiffusionstest positiv getesteten Stämme wurde ein DC-Overlaytest mit den Testorganismen *Bacillus megaterium* und *Escherichia coli* durchgeführt. Trotz eindeutiger Hemmwirkungen im Agardiffusionstest zeigten nur die Rohextrakte der Bakterien AAS8 (Kulturüberstand) und AAS12 (Zellextrakt) eine deutliche Hemmzone von *Bacillus megaterium* im unpolaren Bereich.

Gleichzeitig wurden die organischen Rohextrakte aller Isolate einem chemischen Screening unterzogen. Dabei wurden die jeweiligen Dünnschichtchromatogramme sowohl im UV-Licht als auch mit verschiedenen Sprühreagenzien detektiert. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf positive Reaktionen mit den Sprühreagenzien Antimon(III)-chlorid-Eisessig, Ninhydrin und α -Naphthol gelegt, da diese verhältnismäßig selten auftreten und auf bestimmte Strukturmerkmale wie Steroid-, Amino- oder Zuckeranteile hinweisen. Ein Großteil der detektierbaren Metabolite konnte in mehreren Extrakten nachgewiesen werden. Diese Banden lassen sich auf häufig gebildete Stoffwechselprodukte zurückführen. Sie wurden daher nicht weiter verfolgt. Mit Hilfe des Sprühreagenzes 2',7'-Dichlorfluorescein-Aluminiumchlorid-Eisen(III)-chlorid konnte der spezifische Nachweis erbracht werden, dass die im DC-Overlaytest durch definierte Hemmzonen aufgefallenen Rohextrakte der Bakterien AAS8 (Kulturüberstand) und AAS12 (Zellextrakt) auf Fettsäuren zurückzuführen waren. Die antimikrobielle Wirkung bestimmter Fettsäuren ist in der Literatur schon länger bekannt [Lund et al., 1992; Hatton et al., 1991]. Beispielsweise inhibieren die aus dem schwamm-assoziierten Bakterium *Pseudoalteromonas* spec. isolierten ungesättigten Fettsäuren Palmitoleinsäure (9c) und Heptadecensäure (9c) das Bakterium *Bacillus megaterium*, den Pilz *Ustilago violacea* und die Alge *Chlorella fusca* [Hüners, 1999].

Eine Erklärung für das Fehlen bioaktiver Naturstoffe in schwamm-assoziierten Bakterien aus *Acanthella acuta* könnte in dem Verhältnis von unter Standardbedingungen kultivierbaren zu nicht-kultivierbaren Mikroorganismen liegen. Denn die Entnahme der Lebewesen aus ihrer natürlichen Umgebung hat Einfluss auf ihre metabolische Aktivität, die absolute Zelldichte und die bakterielle Artenvielfalt [DeLong, 1997]. Dieser sogenannte "bottle effect" bewirkt insbesondere, dass sich die kultivierbaren Spezies auf Kosten der nicht-kultivierbaren, die in marinen Habitaten etwa 99 % aller Mikroorganismen ausmachen [Jensen et al., 1996], durchsetzen. Unter Standardbedingungen werden natürlich die bereits kultivierbaren Arten bevorzugt, da sie sich unter optimalen Bedingungen vermehren können. Daher beträgt ihre Verdopplungszeit nur 2.2 h verglichen mit über 50 h für die nicht-kultivierbaren Spezies. Daraus ergibt sich, dass unter Standardbedingungen, wie sie auch in dieser Arbeit angewendet wurden, nur ein Bruchteil der tatsächlich vorhandenen Mikroorganismen aus Invertebraten isoliert werden können. Mögliche

Ansätze, um auch die nicht-kultivierbaren Mikroorganismen zu charakterisieren, liegen in der rekombinanten DNA-Analyse und der molekularen Phylogenetik [Baumann et al., 1997].

Die im chemischen Screening auffälligen Isolate AAS3 (zucker-positiver Zellextrakt) und AAS12 (intrazellulärer roter Farbstoff) wurden ausgewählt, um die Strukturen aufzuklären und Produktbildung und Wachstum zu untersuchen und zu optimieren.

2. *Psychroflexus* spec. (AAS12) aus dem Schwamm *Acanthella acuta*

2.1 Charakterisierung des Bakteriums

Das isolierte Bakterium aus dem Schwamm *Acanthella acuta* ist anhand der 16S rDNA Sequenzierung und des Fettsäureprofiles (Tabelle III.5) dem Komplex *Flavobacterium/Cytophaga/Flexibacter* zuzuordnen. Die höchste Ähnlichkeit mittels 16S rDNA Sequenzanalyse beträgt 90 % zu der neu beschriebenen Gattung *Psychroflexus*. Daher ist Stamm AAS12 Vertreter einer neuen Spezies: *Psychroflexus* spec. nov.

Die Gattung *Psychroflexus* gehört zu der Familie der *Flavobacteriaceae* [Staley, J.T. et al., 1999]. Zu *Psychroflexus* gehören 2 verschiedene Spezies: *Psychroflexus torquis* [Bowman et al., 1999] und *Psychroflexus gondwanense* [Bowman et al., 1998]. Sie wurden aus dem Meereis der Antarktis isoliert [Dobson et al., 1993]. Bei allen Spezies handelt es sich um typisch marine Bakterien, die Meerwasser für ihr Wachstum benötigen. Sie zeichnen sich durch die Synthese der ungewöhnlichen mehrfach ungesättigten Fettsäuren Eicosapentaensäure (20:5 ω 3) und Arachidonsäure (20:4 ω 6) aus.

2.2 Wachstumsoptimierung von *Psychroflexus spec.*

Da *Psychroflexus spec.* während des Screenings auf dem Komplexmedium Marine Broth isoliert worden war, wurde dieses Medium zunächst für Kultivierungen im Schüttelkolben verwendet. Das Wachstum des Bakteriums war jedoch unter den gewählten Bedingungen mit einer maximalen Biotrockenmasse von 1.7 g/l (45 h) relativ dünn. Um das Wachstum und damit eine Zunahme des intrazellulären roten Farbstoffes zu erhöhen, wurde eine Wachstumsoptimierung von *Psychroflexus spec.* durchgeführt.

Zunächst wurde die alleinige Verwertbarkeit verschiedener definierter C-Quellen überprüft. Da keine der zugegebenen C-Quellen von *Psychroflexus spec.* verwertet werden konnte, wurde im nächsten Schritt eine Wachstumssteigerung durch die Variation der komplexen Bestandteile Hefeextrakt und Pepton im Komplexmedium Marine Broth untersucht. Zum einen zeigen die Ergebnisse, dass Hefeextrakt besser verwertet wurde als Pepton (Abbildung III.2). Die maximal erreichbare Biotrockenmasse von 2.4 g/l konnte bei einer Zugabe von 10 g/l Hefeextrakt erzielt werden. Zum anderen konnte die Biotrockenmasse durch eine Kombination von Hefeextrakt (10 g/l) und Pepton (3 g/l) auf 2.9 g/l gesteigert werden (Abbildung III.3).

Die in Tabelle IV.2 dargestellte Zusammensetzung der Inhaltsstoffe der verwendeten komplexen Bestandteile kann diesen Zusammenhang erklären. Dass das Wachstum durch die Zugabe von Hefeextrakt stärker gefördert wird als durch die gleiche Menge an zugesetztem Pepton, liegt wahrscheinlich an der im Hefeextrakt fünf- bis zehnfach höheren Konzentration der Vitamine, Aminosäuren und Spurenelemente. Die zusätzliche Wachstumssteigerung, die durch eine Kombination von zugesetztem Hefeextrakt und Pepton erzielt wird, kann mit der Zugabe der Aminosäuren Cystin und Tryptophan erklärt werden, die nur im Pepton vorhanden sind. Auch die 2.5-fache Konzentration an Biotin im Pepton kann das Wachstum gefördert haben.

Tabelle IV.2: Zusammensetzung der komplexen Bestandteile Hefeextrakt (Difco) und Pepton (Difco).

| Inhaltsstoff | Hefeextrakt | Pepton |
|-----------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Vitamine | Biotin (1 µg/g) | Biotin (2.5 µg/g) |
| | Nicotinsäure (280 µg/g) | Nicotinsäure (35 µg/g) |
| | Thiamin (3 µg/g) | |
| | Pyridoxin (20 µg/g) | Pyridoxin (2.5 µg/g) |
| | Riboflavin (20 µg/g) | Riboflavin (4 µg/g) |
| Aminosäuren | Arginin (10 mg/g) | Arginin (8 mg/g) |
| | Asparaginsäure (50 mg/g) | Asparaginsäure (6 mg/g) |
| | | Cystin * (0.22 mg/g) |
| | Glutaminsäure (65 mg/g) | Glutaminsäure (11 mg/g) |
| | Glycin (25 mg/g) | Glycin (23 mg/g) |
| | Histidin (10 mg/g) | Histidin (1 mg/g) |
| | Isoleucin (30 mg/g) | Isoleucin (2 mg/g) |
| | Leucin (35 mg/g) | Leucin (3.5 mg/g) |
| | Lysin (40 mg/g) | Lysin (4.5 mg/g) |
| | Methionin (10 mg/g) | Methionin (1 mg/g) |
| | Phenylalanin (20 mg/g) | Phenylalanin (2.5 mg/g) |
| | Threonin (35 mg/g) | Threonin (1.5 mg/g) |
| | | Tryptophan (0.42 mg/g) |
| | Tyrosin (5 mg/g) | Tyrosin (1 mg/g) |
| | Valin (35 mg/g) | Valin (3 mg/g) |
| Spurenelemente | Cu (19 µg/g) | Cu (17 µg/g) |
| | Mn (7.8 µg/g) | Mn (8.6 µg/g) |
| | Fe (16 µg/g) | Fe (15 µg/g) |
| | Zn (88 µg/g) | Zn (18 µg/g) |

* Dipeptid

Mit einer Variation der Kultivierungstemperaturen wurde ein Temperaturprofil von *Psychroflexus* spec. erstellt, da die Gattung *Psychroflexus* für ihre niedrigen optimalen Wachstumstemperaturen (< 10°C) bekannt ist [Staley, J.T. et al., 1999]. Zwar konnte auch bei niedrigen Temperaturen (4 bis 15°C) ein gutes Wachstum mit Biomassenkonzentrationen von 2.2 bis 2.75 g/l beobachtet werden, aber das Temperaturoptimum für *Psychroflexus* spec. liegt bei 23°C (BTM_{max} = 3.2 g/l). Dieses für ein psychrophiles Bakterium relativ hohe Temperaturoptimum kann durch die Anpassung von *Psychroflexus* spec. an seinen Lebensraum, den Schwamm *Acanthella acuta*, erklärt werden. Denn dieser Schwamm ist im Litoral des Mittelmeers beheimatet [Riedel, R., 1983] und die mittlere Wassertemperatur beträgt dort ca. 20°C. Da das ökologische Temperaturoptimum oft im selben Bereich wie das physiologische Temperaturoptimum liegt [Sommer, U., 1998], erscheint die optimale

Wachstumstemperatur von 23°C für *Psychroflexus* spec. plausibel. Dafür spricht auch, dass die Ähnlichkeit zu der Gattung *Psychroflexus* mittels 16S rDNA Sequenzanalyse bei 90 % liegt. Dies lässt genügend Raum für eigene Anpassungen von *Psychroflexus* spec.

Ein Scale-up der im Schüttelkolben optimierten Bedingungen erfolgte im 50 l Bioreaktor. Um einen direkten Vergleich zwischen den Ergebnissen zu ermöglichen, sind in Tabelle IV.3 die wichtigsten Daten aufgeführt. Bezüglich des Zellwachstums lieferte die Bioreaktorkultivierung auf Marine Broth mit 10 g/l Hefeextrakt und 3 g/l Pepton die besten Ergebnisse. Bei verkürzter Kultivierungsdauer (36 statt 45 h) wurde mit 3.5 g/l mehr als doppelt so viel Biotrockenmasse gebildet. Auch im Vergleich zur entsprechenden Kultivierung im Schüttelkolben konnte eine Wachstumssteigerung der Biotrockenmasse von 3.2 auf 3.5 g/l beobachtet werden. Die unterschiedliche Sauerstoffversorgung im Schüttelkolben bzw. Bioreaktor kann diese unterschiedlichen Ergebnisse erklären. Bei Kultivierungen im Schüttelkolben wird eine sehr schlechte Sauerstoffversorgung erreicht, da nur eine begrenzte Diffusion von Sauerstoff durch den Wattestopfen möglich ist. Bei sehr hoher Umdrehungszahl kann im Schüttelkolben maximal ein Viertel der im Bioreaktor möglichen Sauerstofftransportrate erzielt werden. Da außer einer pH-Regelung, die nur für den Ausgleich eines geringen pH-Anstiegs erforderlich war, gleiche Bedingungen im Schüttelkolben herrschten, ist die Zunahme der Biotrockenmasse auf die bessere Durchmischung und der daraus resultierenden verbesserten Sauerstoffversorgung zurückzuführen.

Tabelle IV.3: Vergleich der Kultivierungen von *Psychroflexus* spec. auf Marine Broth (MB), Marine Broth + 10 g/l Hefeextrakt + 3 g/l Pepton (MB + HE + P).

| Parameter | SK* (MB) | SK* (MB + HE + P) | BR** + (MB + HE + P) |
|--------------------------|-------------|-------------------|----------------------|
| BTM _{max} [g/l] | 1.7 (45 h) | 3.2 (44 h) | 3.5 (36 h) |
| OD _{max} | 1.8 (45 h) | n.b. | 4.0 (36 h) |
| Dauer [h] | 80 | 70 | 55 |
| Temperatur [°C] | 27 | 23 | 23 |
| μ _{BTM} [1/h] | 0.18 (35 h) | n.b. | 0.20 (18 h) |

* SK: Schüttelkolben; ** BR: 50 l Bioreaktor; n.b.: nicht bestimmt

2.3 Charakterisierung des Farbstoffes aus *Psychroflexus spec.*

Aus *Psychroflexus spec.* konnten die drei orange-roten Farbstoffe PFP1, PFP2 und PFP3 isoliert werden. Die Auswertung der NMR-, Massen- und UV/VIS-Spektren ergab das Carotenoid Caloxanthin ((2R,3R,3'R)- β,β -carotene-2,3,3'-triol). Eine vollständige Charakterisierung der Pigmente PFP1 und PFP3 war aufgrund der geringen Ausbeute von weniger als 1 mg nicht möglich. Anhand einiger Strukturmerkmale konnten sie jedoch ebenfalls der Gruppe der Carotenoide zugeordnet werden. Caloxanthin kommt in wenigen Spezies der Cyanobakterien [Stransky et al., 1970] (*Nostoc communa* und *Anacystis nidulans*) und in der α 4-Subklasse der aeroben phototrophen Bakterien vor. Dazu gehören *Erythrobacter longus* [Takaichi et al., 1991, 1990, 1988], *Porphyrobacter neustonensis* [Frank et al., 1999], *Porphyrobacter tepidarius* [Hanada et al., 1997] und *Erythromicrobium ramosum* [Yurkov et al., 1993]. Ungewöhnlich an Caloxanthin (Abb. III.5a) ist der 3-OH- β -Ring [Liaeeen-Jensen, 1990].

Eine weitere Charakterisierung der Pigmente PFP1 und PFP3 wäre interessant, da Carotenoide eine große wirtschaftliche und biologische Bedeutung besitzen. Sie werden als Lebensmittelfarbstoffe und als Futterzusätze in der Industrie eingesetzt, wirken als Provitamine und bieten Zellen als Antioxidantien Schutz vor Strahlung [Nuhn, 1997; Mathews-Roth, 1991; Miki, 1991]. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit vieler Carotenoide und der teilweise recht komplexen Strukturen werden ständig alternative Quellen zur chemischen Totalsynthese dieser Verbindungen gesucht.

Beispielsweise produziert die Mikroalge *Dunaliella salina* β -Carotin (10 % der Biotrockenmasse). Produziert wird dabei in großen und offenen Teichen (bis zu 250 ha) an der Küste Westaustraliens [Borowitzka, 1999]. Das dabei gewonnene β -Carotin hat einen Marktwert von 600 US \$/kg und findet Anwendung als Lebensmittelfarbstoff und Nahrungsmittelzusatz. Das jährliche Marktvolumen dieser beiden Produkte beträgt jeweils 10 bis 100 Mio. US \$.

Canthaxanthin, das als Zusatz von Geflügel- und Fischfutter Anwendung findet, konnte aus *Brevibacterium spec.* mit einer Ausbeute von 9.3 mg/l gewonnen werden [Nelis et al., 1989].

Aufschlussreich sind auch Berichte über Carotenoide, die aus schwamm-assoziierten Bakterien isoliert wurden. So bildet *Pseudomonas* spec. KK10206C aus dem Schwamm *Halichondria okadae* das C₅₀-Carotinoid Okadaxanthin, das in biologischen Tests Unterdrückungseffekte gegenüber aktiven Sauerstoffspezies zeigte [Miki et al., 1994]. Eine japanische Arbeitsgruppe verglich die Carotenoidzusammensetzung des Schwammes *Reniera japonica* mit der des schwamm-assoziierten Bakteriums *Flexibacter* spec., um die Herkunft der Carotenoide zu klären [Miki et al., 1996]. Dabei konnte aufgrund der Mengenverhältnisse das Bakterium als Produzent des Carotenoids Zeaxanthin identifiziert werden. Da aber auch geringe Mengen dieses Farbstoffs im Schwamm nachgewiesen werden konnten, erscheint ein Stofftransport vom Bakterium in den Schwamm plausibel. Eine Erklärung für diese Symbiose, könnte in dem Schutz vor Strahlung durch die Carotenoide zu sehen sein. Dieser Zusammenhang ist möglicherweise auch auf das in dieser Arbeit untersuchte System *Acanthella acuta* / *Psychroflexus* spec. übertragbar.

3. *Bacillus subtilis* (AAS3) aus dem Schwamm *Acanthella acuta*

3.1 Charakterisierung des Bakteriums

Das isolierte Bakterium aus dem Schwamm *Acanthella acuta* ist anhand der 16S rDNA Sequenzierung der Gruppe der Grampositiven Bakterien und der Familie der *Bacillaceae* zuzuordnen. Die höchste Ähnlichkeit mittels 16S rDNA Sequenzanalyse beträgt 97 % zu der Spezies *Bacillus subtilis*. Er ist von stäbchenförmiger Gestalt (2,0 - 3,0 µm lang, Ø 0,7 - 0,9 µm) und peritrich begeißelt [Sinclair, 1989]. Unter ungünstigen Umweltbedingungen ist *Bacillus subtilis* in der Lage, äußerst widerstandsfähige Endosporen zu bilden [Knott et al., 1995].

Die Art *Bacillus subtilis* ist bekannt für die Produktion von hydrophilen Oligopeptiden und Lipopeptiden [Loeffler et al., 1990]. In repräsentativen Schüttelkulturen konnten zu Beginn des Wachstums vorwiegend hydrophile Oligopeptidantibiotika wie Bacilysin [Loeffler et al., 1990; Hilton et al., 1988; Walker et al., 1970], Chlorotetain

und Rhizocticin [Loeffler et al., 1990] und in der stationären Wachstumsphase Lipopetidantibiotika vom Iturin-, Fengymycin- und Surfactin-Typ sowie das Cyclopeptid Mycobacillin [Schneider et al., 1999; Ohno et al., 1995; Besson, 1994; Loeffler et al., 1990] nachgewiesen werden. In Abb. IV.1 sind einige dieser Naturstoffe dargestellt.

Surfactine und Iturine sind zyklische Lipoheptapeptide, in die eine β -Hydroxy- bzw. β -Amino-Fettsäure integriert ist. Die Zyklisierung von Surfactin erfolgt über eine Laktonisierung. Iturin zyklisiert über eine Peptidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Serinrests und der Aminogruppe der Fettsäure. Fengycin ist ein Lipodecapeptid, das eine β -Hydroxy-Fettsäure in seiner Seitenkette enthält. Diese Lipopeptide kommen in der Natur als Gemische von Strukturisomeren vor, die in ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. in ihrer Fettsäurekomponente variieren. Aus der Vielfalt der Strukturbausteine dieser Verbindungen ergeben sich zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten.

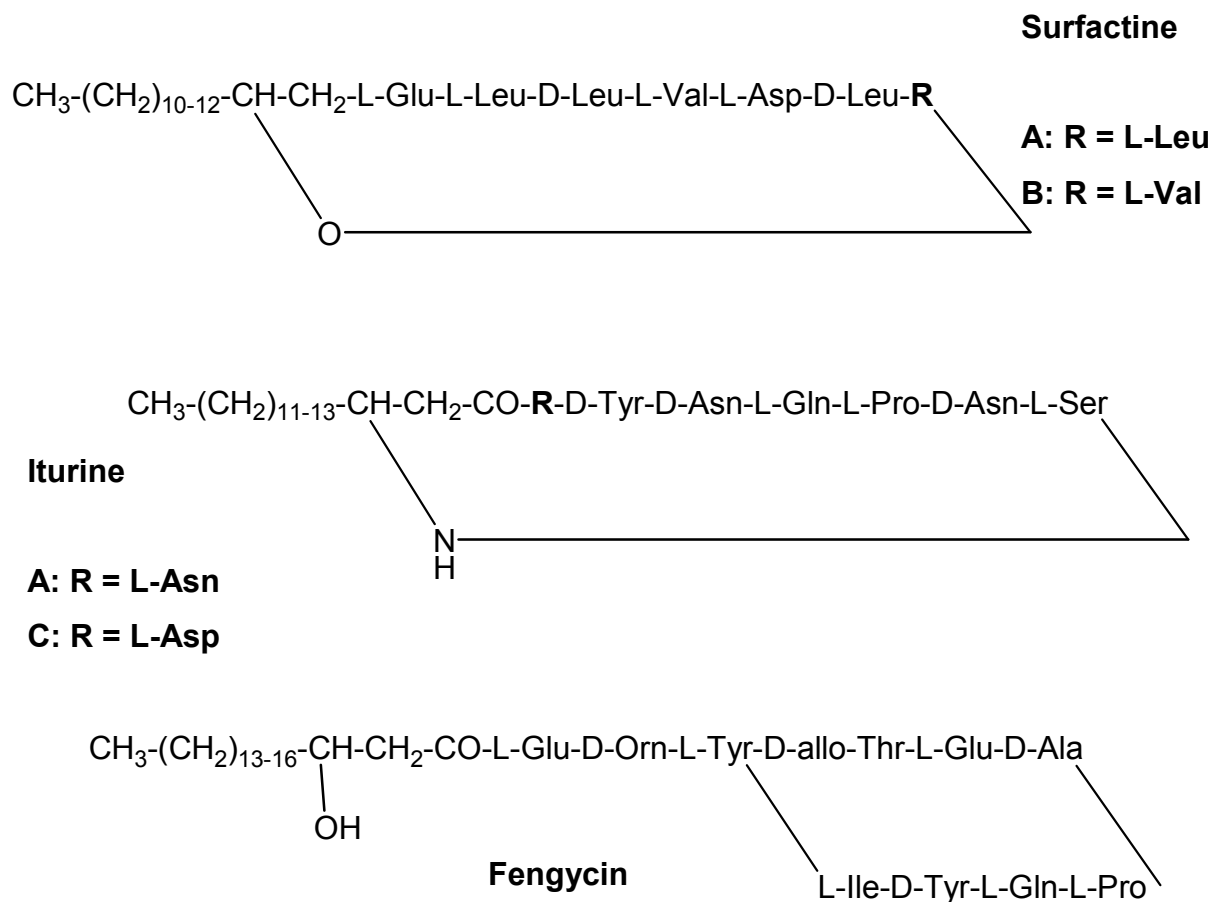


Abbildung IV.1: Surfactine A-C, Iturine A und C und Fengycin aus *Bacillus subtilis*.

Beispielsweise wirken die Surfactine antimikrobiell [Imai et al., 1971; Thomas et al., 1969], antimykoplasmatisch [Nissen et al., 1997; Vollenbroich et al., 1996], antiviral [Dittmann et al., 1994; Hiramoto et al., 1970] und antitumoral [Kameda et al., 1974; 1972]. Außerdem ist Surfactin ein Biotensid, das die Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf 27 mN/m herabsetzt und eine kritische Micellbildungskonzentration von 0.10 g/l besitzt [Fox et al., 2000].

Ebenfalls bioaktive Eigenschaften weist das aus dem Sediment isolierte marine Bakterium *Bacillus* spec. PhM-PHD-090 auf. Aus dem Kulturüberstand konnte das neue Isocoumarin PM-94128 gewonnen werden (Abb. IV.2). Dieses Molekül hemmt die Proteinsynthese mit einem IC_{50} -Wert von 0.1 μ M und die DNA-Synthese verschiedener Tumorzelllinien mit einem IC_{50} -Wert von 2.5 μ M [Canedo et al., 1997].

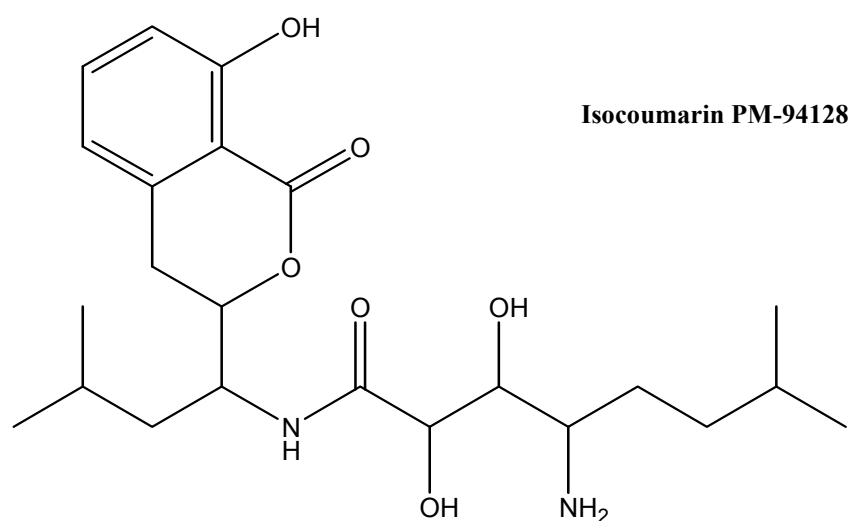


Abbildung IV.2: Isocoumarin PM-94128 aus *Bacillus* spec. PhM-PHD-090.

3.2 Wachstums- und Produktoptimierung des marinen *Bacillus subtilis*

Da *Bacillus subtilis* während des Screenings auf dem Komplexmedium Marine Broth isoliert worden war, wurde dieses Medium zunächst für die Kultivierungen verwendet. Nach der Entscheidung, im Rahmen dieser Arbeit die experimentellen Untersuchungen auf den Stamm *Bacillus subtilis* zu konzentrieren, wurde für die weiteren Fermentationen das Komplexmedium Marine Broth durch ein Medium mit einer definierten Zusammensetzung ersetzt. Dadurch konnte durch gezielte Variation einzelner Mediumskomponenten das Wachstum und die Glycoglycerolipidproduktion von *Bacillus subtilis* gesteigert und optimiert werden.

Aus den in der Literatur [Sokoll, 1999; Dolej, 1998; Landy et al., 1948] zahlreich beschriebenen Medien wurde das Synthetische Meerwassermedium SM1 [Passeri et al., 1992] ausgewählt. In diesem Medium sind alle im Meerwasser vorkommenden Mineralsalze enthalten. Anhand dieses Basismediums konnten Kohlenstoff- und Stickstoffquelle, Phosphatmenge, Zusatz von komplexen Bestandteilen sowie einige äußere Parameter unabhängig voneinander variiert und deren Einfluss auf die Bildung des GGL11 untersucht werden. Für die Bewertung der Ergebnisse wurden die Biotrockenmasse, die Glycoglycerolipidmenge und die daraus abgeleitete spezifische Glycoglycerolipidbildung herangezogen.

Zunächst wurde die geeignete Kohlenstoffquelle für das Wachstum und die Produktbildung von *Bacillus subtilis* ermittelt. Die in Tabelle III.7 aufgeführten Ergebnisse zeigen eindeutig, dass Glucose im Vergleich zu allen anderen untersuchten C-Substraten die größte Wachstumssteigerung und Produktbildung bewirkte. Dieses Ergebnis ist nicht überraschend, da durch zahlreiche Literaturveröffentlichungen bekannt ist, dass *Bacillus subtilis* bevorzugt Glucose als C-Substrat verstoffwechselt. Beispielsweise produziert *Bacillus subtilis* im industriellen Maßstab das Nukleosid Adenosin. Dabei werden aus 80 g/l Glucose in 104 h 9 g/l Adenosin gebildet [Nishiyama et al., 1993]. Eine Induktion der Glycoglycerolipidproduktion von *Bacillus subtilis* durch Glucose oder Glycerin als Substrat kann ausgeschlossen werden, obwohl beide Verbindungen Bestandteil des Glycoglycerolipids sind, da GGL11 auch in reinem Marine Broth produziert wird.

Durch die Zugabe von Glucose konnte deshalb eine verstärkte Produktbildung erreicht werden, weil die Produktion des Glycoglycerolipids wachstumsgekoppelt ist. Während der exponentiellen Wachstumsphase steigt auch die Konzentration an GGL11 exponentiell an, um während der stationären Phase wieder abzunehmen. Wahrscheinlich wird es dann als Substrat verstoffwechselt. Von anderen Mikroorganismen ist bekannt, dass das Produktspektrum durch den gezielten Einsatz verschiedener Substrate beeinflusst werden kann [Göbbert et. al., 1988]. Einen Einfluss auf das Produktspektrum von *Bacillus subtilis* konnte durch die Variation der Kohlenstoffquellen nicht beobachtet werden.

Da das Synthetische Meerwassermedium SM1 keine Vitamine, Aminosäuren oder Spurenelemente enthält, wurden diese in Form von komplexen Bestandteilen zugegeben. Zum einen zeigen die Ergebnisse, dass Hefeextrakt besser verwertet wurde als Pepton (Tabelle III.9). Zum anderen konnte die Biotrockenmasse auch durch eine Kombination von Hefeextrakt und Pepton nicht gesteigert werden. Dass das Wachstum durch die Zugabe von Hefeextrakt stärker gefördert wird als durch die gleiche Menge an zugesetztem Pepton, liegt wahrscheinlich an der im Hefeextrakt fünf- bis zehnfach höheren Konzentration der Vitamine, Aminosäuren und Spurenelemente (Tabelle IV.2).

Die optimalen Glucose- bzw. Hefeextraktkonzentration bezogen auf Wachstum und Glycoglycerolipidbildung wurde für *Bacillus subtilis* auf SM1 mit 20 g/l Glucose und 10 g/l Hefeextrakt erreicht. Dabei konnte eine maximale spezifische Produktbildung an GGL11 von 6.5 mg pro g Biotrockenmasse erzielt werden. Obwohl höhere Glucose- und Hefeextraktkonzentrationen ein besseres Wachstum ergaben, wurde im Verhältnis weniger GGL11 gebildet.

Anhand eines Temperaturprofils von 4 bis 37°C wurde der Einfluss der Temperatur auf die Produktion des Glycoglycerolipids untersucht. Die Produktbildung von *Bacillus subtilis* wies eine hohe Temperaturtoleranz auf. Bei allen untersuchten Temperaturen betrug die spezifische Produktbildung an GGL11 mehr als 4.9 mg/g BTM. Bei der Beurteilung der relativ hohen Produktivität bei niedrigen Temperaturen muss die verlängerte Kultivierungsdauer (Verdopplung bei 4°C und 10°C) berücksichtigt werden. Das Temperaturoptimum lag bei 30°C. Dabei wurde eine

spezifische Produktausbeute an GGL11 von 7.4 mg/g BTM erreicht. Die hohe Temperaturtoleranz von *Bacillus subtilis* wird durch zahlreiche Literaturveröffentlichungen bestätigt. Beispielsweise ermittelte Sinclair, dass Wachstum in einem Temperaturbereich von 5 bis 55°C stattfindet [Sinclair, 1989].

Da *Bacillus subtilis* auch in terrestrischen Habitaten weit verbreitet ist, wurde der Einfluss der Mineralsalzkonzentration auf das Wachstum und die Produktbildung untersucht. Dabei zeigte sich, dass *Bacillus subtilis* hohe Salzkonzentrationen toleriert. Bis zu der im Meerwasser vorherrschenden Mineralsalzkonzentration konnte kein Absinken der spezifischen Produktausbeute festgestellt werden. Sie lag sowohl für die natürliche als auch für die halbe bzw. ein Zehntel der im Meerwasser vorherrschenden Mineralsalzkonzentration bei 7.4 mg GGL11 pro g Biotrockenmasse. Erst bei höheren Mineralsalzkonzentrationen ist eine Verringerung der Produktivität festzustellen. Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass *Bacillus subtilis* tolerant auf die Veränderung von Umweltbedingungen reagiert und sich dadurch problemlos verschiedenen Habitaten anpassen kann.

Neben Ammoniumchlorid wurden auch Ammoniumsulfat, Ammoniumnitrat und Natriumnitrat als zusätzliche Stickstoffquellen getestet. Alle eingesetzten Stickstoffquellen begünstigten das Wachstum und die Produktbildung von *Bacillus subtilis*. Dabei zeigte Ammoniumchlorid in einer Konzentration von 5 g/l mit 7.4 mg/g BTM die höchste Produktausbeute. Lediglich Natriumnitrat fiel mit 5.9 mg/g BTM an GGL11 leicht ab. Dies lässt auf eine leichtere Verwertbarkeit von Ammoniumionen schließen. Die gute Verwertbarkeit verschiedener Stickstoffquellen kann mit der substratinduzierten Expression der für den Stickstoff-Metabolismus verantwortlichen Gene erklärt werden. Je nach verfügbarer Stickstoffquelle werden unterschiedliche Enzymsysteme für die Verwertbarkeit exprimiert [Fisher, 1999].

Mehrere Veröffentlichungen zeigen, dass die Phosphatkonzentration im Medium die Glycolipidbildung sowohl quantitativ [Vollbrecht, 1999; Frautz, 1986] als auch qualitativ hinsichtlich einer Veränderung des Produktspektrums [Benning et al., 1995] beeinflussen kann. Daher wurde der Einfluss der Phosphatkonzentration auf das Wachstum und die Produktbildung untersucht. Alle eingesetzten Phosphatkonzentrationen (inkl. ohne zusätzliches Na₂HPO₄) förderten das Wachstum und die

Produktbildung von *Bacillus subtilis*. Die höchste spezifische Produktbildung wurde mit einer Phosphatkonzentration von 0.89 g/l erzielt. Eine Veränderung des Produktspektrums konnte bei keinem Ansatz festgestellt werden.

Ein Scale-up der im Schüttelkolben optimierten Bedingungen erfolgte im 50 l Bioreaktor. Beide Systeme unterschieden sich nur in der pH-Wert-Regelung, der im Reaktor kontinuierlich konstant gehalten wurde, in der Sauerstoffversorgung, die im Reaktor definiert eingestellt werden konnte und im Rührsystem, das im Kolben lediglich aus einem Schütteln bei konstanter Umdrehungszahl bestand. Die Bioreaktorkultivierungen wurden sowohl auf Marine Broth mit einem Zusatz von 20 g/l Glucose als auch auf SM1 mit 20 g/l Glucose und 10 g/l Hefeextrakt durchgeführt. Um einen direkten Vergleich zwischen den Ergebnissen zu ermöglichen, sind in Tabelle IV.4 die wichtigsten Daten aufgeführt.

Tabelle IV.4: Vergleich der Kultivierungen von *Bacillus subtilis* auf Marine Broth (MB), Marine Broth + 20 g/l Glucose (MB+G) und SM1 + 20 g/l Glucose + 10 g/l Hefeextrakt (SM1).

| Parameter | SK* (MB) | BR** (MB+G) | SK* (SM1) | BR** (SM1) |
|----------------------|----------|----------------|----------------|----------------|
| Dauer | 26 h | 19 h | 20 h | 20 h |
| Temperatur | 27°C | 27°C | 30°C | 30°C |
| BTM _{max} | 2.0 g/l | 7.6 g/l | 9.5 g/l | 10.5 g/l |
| GGL11 _{max} | n.b. | 30 mg/l (13 h) | 70 mg/l (12 h) | 91 mg/l (11 h) |
| μ_{\max} | 0.34 1/h | 0.46 1/h | 0.52 1/h | 0.55 1/h |
| P _V | n.b. | 2.31 mg/[l*h] | 5.83 mg/[l*h] | 8.27 mg/[l*h] |
| Y _{P/X} | n.b. | 4.0 mg/g | 7.4 mg/g | 8.7 mg/g |
| Y _{P/S} | n.b. | 1.7 mg/g | 3.9 mg/g | 5.1 mg/g |

* SK: Schüttelkolben; ** BR: 50 l Bioreaktor; n.b.: nicht bestimmt

Hinsichtlich des Wachstums und der Glycoglycerolipidbildung lieferte die Bioreaktorkultivierung auf SM1 mit 20 g/l Glucose und 10 g/l Hefeextrakt eindeutig die besten Ergebnisse. Die gebildete Biotrockenmasse konnte um den Faktor 5 von 2 g/l auf 10.5 g/l gesteigert werden. Parallel dazu stieg die spezifische

Wachstumsrate von 0.34 1/h auf 0.55 1/h an. Auch konnte die Produktbildung von GGL11 von 30 mg/l auf 91 mg/l mehr als verdreifacht werden. Gleichzeitig hat sich die spezifische Produktbildung mehr als verdoppelt. Zusätzlich konnte der Zeitpunkt der maximalen Produktbildung um 16 % (von 13 h auf 11 h) verkürzt werden. Der limitierende Parameter bei dieser Kultivierung war die Kohlenstoffquelle Glucose. Nach 15 h war keine Glucose im Medium mehr nachzuweisen und parallel dazu vollzog sich der Übergang in die stationäre Phase. Zwar konnte auch im Schüttelkolben gezeigt werden, dass höhere Glucosekonzentrationen zu einem stärkeren Wachstumsanstieg führten, aber gleichzeitig verringerte sich die ökonomisch sinnvollere Größe der spezifischen Produktbildung, da die Konzentration des GGL11 weniger stark zunahm als die Biotrockenmasse.

Der Vergleich mit der entsprechenden Kultivierung im Schüttelkolben zeigt deutlich, dass die Bedingungen im Bioreaktor das Wachstum und die Produktbildung positiv beeinflusst haben. Die kontinuierliche pH-Korrektur im Bioreaktor kann als Ursache vernachlässigt werden, da einerseits eine manuelle pH-Korrektur (zweimal pro Tag) im Schüttelkolben durchgeführt wurde und somit der pH-Wert im für *Bacillus subtilis* optimalen Bereich von 6.0 bis 7.5 gehalten werden konnte und andererseits *Bacillus subtilis* pH-Werte von 4.5 bis 8.6 toleriert [Wandke, 1992; Sneath et al., 1986; Thimann, 1964]. Daher kann als Ursache der definierte Sauerstoffeintrag und die durch das Rührsystem bedingte bessere Sauerstoffverteilung im Reaktor angesehen werden (Kapitel IV.2.2).

Die absolute Ausbeute von maximal 91 mg/l ist sehr niedrig. Beispielsweise produziert das aus einer Bodenprobe isolierte grampositive Bakterium *Tsukamurella* spec. mit 20 g/l Sonnenblumenöl als C-Quelle bis zu 4.5 g/l Oligosaccharidlipide [Vollbrecht et al., 1998]. Im Unterschied zu *Bacillus subtilis* werden die Glycolipide jedoch primär erst unter Stickstofflimitierung während der stationären Phase gebildet und dann ausgeschieden. Eine ebenfalls wie bei *Bacillus subtilis* streng wachstumsgekoppelte und zellwand-assoziierte Glycolipidbildung zeigen die Stämme *Microbacterium* spec. mit einer Ausbeute von 200 mg/l Glucosyl-Mannosylglycerolipid [Wicke et al., 2000] und aus *Corynebacterium* spec. M9b mit einer Ausbeute von 205 mg/l Saccharose-Corynemycolat [Göbbert et al., 1988]. Bis zu 1.7 g/l Glucoselipid werden von dem marinen Bakterium MM1 produziert [Passeri

et al., 1992]. Vergleichbar hohe Ausbeuten an GGL11 sind bei *Bacillus subtilis* nicht zu erwarten, da die Bildung des Glycoglycerolipids als Zellwandbestandteil nicht durch die Zugabe bestimmter Substrate induziert oder gesteuert werden kann. Außerdem wird GGL11 im Gegensatz zu vielen anderen Glycolipiden nicht als Sekundärmetabolit unter Substratlimitierung während der stationären Phase gebildet, sondern in dieser Phase bereits kontinuierlich abgebaut.

Um die Produktion des Glycoglycerolipids in der Zukunft noch zu erhöhen, wären weitere biotechnologische Kulturführungen denkbar. Beispielsweise könnte durch Fed-Batch-Kultivierungen die exponentielle Wachstumsphase verlängert und somit eine erhöhte GGL11-Ausbeute ermöglicht werden. Darüberhinaus wäre auch die kontinuierliche Kultivierung eine denkbare Option, um die Produktivität von *Bacillus subtilis* zu steigern.

3.3 Charakterisierung des Glycoglycerolipids aus *Bacillus subtilis*

Aus *Bacillus subtilis* konnte das Glycoglycerolipid GGL11 isoliert werden. Dabei handelt es sich um ein 1,2-O-diacyl-3-[β -glucopyranosyl-(1-6)- β -glucopyranosyl)]-glycerin (Abbildung III.10).

Ähnliche zellwandassoziierte Glycoglycerolipide kommen in mehreren Spezies der Grampositiven Bakterien vor. Darunter befinden sich neben *Bacillus subtilis* auch weitere Vertreter der Familie *Bacillaceae*: *Bacillus cereus* und *Bacillus licheniformis* [Button et al., 1976; Lang et al., 1970; Brundish et al., 1968]. Außerdem konnte es in einigen Vertretern der Familie *Micrococcaceae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus lactis* und *Staphylococcus saprophyticus* [Fischer et al., 1978; Komaratat et al., 1975; Brundish et al., 1968] und einem Vertreter der Gattung *Microbacterium*, *Microbacterium* spec. [Wicke et al., 2000] nachgewiesen werden.

Von Glycoglycerolipiden wird auch im Zusammenhang mit verschiedenen anderen Organismen berichtet. Die im Mittelmeer beheimatete Grünalge *Caulerpa taxifolia*

produziert mehrere Galactosylglycerolipide [Mancini et al., 1998]. Ebenfalls aus Kulturen verschiedener Cyanobakterien wurden Mono- und Digalactosyldiacylglycerine nachgewiesen [Falch et al., 1995; Murakami et al., 1991]. Auch die Gruppe der coryneformen Bakterien ist für die Synthese zahlreicher Glycoglycerolipide bekannt. Beispielsweise konnten aus *Microbacterium* spec. ein neuartiges Glucosyl-Mannosylglycerolipid [Wicke et al., 2000] und aus *Arthrobacter atrocyaneus* ein ebenfalls neuartiges Dimannosylglycerolipid isoliert werden [Niepel et al., 1997].

Die Fettsäurereste der Diglycosyldiacylglycerolipide bestehen überwiegend aus gesättigten, einfach ungesättigten und verzweigten Fettsäuren. Beispielsweise enthalten die Diglucosylglycerolipide der Gattungen *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Microbacterium* überwiegend die Fettsäuren anteiso- C 15:0 und C 17:0 [Collins et al., 1983; Komaratat et al., 1975; Saito et al., 1971].

Die Mechanismen der Biosynthese der Diglycosyldiacylglycerine in Bakterien ist analog denen in Algen oder höheren Pflanzen und beinhaltet einen Glycosyl-Transfer von einem verfügbaren Nucleosid-Diphosphat-Zucker auf eine freie Hydroxylgruppe eines 1,2-Diacyl-sn-glycerins. Dieser Schritt führt zu einem Monoglycosyldiacylglycerin. Analog kann nun eine zweite Glycosylgruppe übertragen werden. Das 1,2-Diacyl-sn-glycerin wird durch die schrittweise Acylierung von sn-3-Glycerophosphat zu 1,2-Diacyl-sn-3-glycerophosphat und anschließender Dephosphorylierung des Diacylglycerophosphates durch die Phosphatidsäure-Phosphatase synthetisiert [Kates, 1990].

4. Modifikation des Glycoglycerolipids GGL11 aus *Bacillus subtilis*

Im Laufe der letzten 20 Jahre wurde die Verwendung von Biokatalysatoren für die organische Synthese eine immer attraktivere Alternative zu konventionellen chemischen Methoden [Bornscheuer et al., 1999]. Da Enzyme häufig sehr chemo-, regio- und enantioselektiv reagieren, sind sie für die pharmazeutische Industrie besonders attraktiv, da hier das Interesse an enantiomerenreinen und spezifisch

funktionalisierten Verbindungen kontinuierlich wächst. Außerdem werden enzymkatalysierte Reaktionen in der Regel unter milden Bedingungen durchgeführt, etwa bei Raumtemperatur und bei neutralem pH, was die Gefahr von Produktisomerisierung, racemisierung und -epimerisierung minimiert. Weiterhin können Enzyme sehr effiziente Katalysatoren sein, die Reaktionsgeschwindigkeiten bis auf das 10^{12} -fache erhöhen. Schließlich sind biokatalytische Prozesse weniger gefährlich, umweltschonender und energiesparender als konventionelle chemische Methoden.

Die gezielte biochemische Übertragung von Fettsäuren oder Fettalkoholen auf Kohlenhydrate oder deren Derivate, z.B. Glycoglycerine zur Bildung von Emulgatoren ist für die chemische Industrie (Kosmetika, Pflanzenschutzmittel) von großem Interesse. Diese Biotenside könnten die chemisch synthetisierten Zuckerlipide ersetzen, die häufig in toxikologisch nicht unbedenklichen Lösemitteln hergestellt werden sowie den Nachteil der Mehrfachveresterung zeigen. Außerdem gewinnen Glycolipide in den letzten Jahren eine zunehmende Bedeutung als bioaktive Wirkstoffe in der pharmazeutischen Forschung. Beispielsweise zeigen zahlreiche Glycoglycerolipide vielversprechende antitumorale Wirkungen, die in Zukunft in der Krebsprävention eine große Rolle spielen könnten [Matsufuji et al., 2000; Colombo et al., 1999; Murakami et al., 1995]. Daher wird es in Zukunft von immer größerer Bedeutung sein, die bioaktive Wirkung der Glycoglycerolipide durch gezielte enzymatische Modifikation zu steigern.

Als Biokatalysatoren werden für diese Aufgaben seit Mitte der 80er Jahre bevorzugt Lipasen eingesetzt, deren Fähigkeit, Triglyceride in wässrigen Medien zu hydrolysieren, schon viel länger genutzt wird. In organischen Lösemitteln katalysieren sie dagegen unter nahezu wasserfreien Bedingungen die Rückreaktion. Außerdem ermöglichen organische Lösemittel die Solubilisierung hydrophober Substrate, leichtere Produktisolierung, leichtere Zurückgewinnung des unlöslichen Biokatalysators und die erhöhte Thermostabilität des Biokatalysators. Aufgrund ihrer Eigenschaft, bevorzugt primäre Hydroxygruppen zu acylieren, ist im Vergleich zu chemischen Methoden die Regioselektivität der Reaktion bei Zuckerderivaten mit einer $-CH_2-OH$ -Gruppe gegeben. Liegen zwei primäre Hydroxygruppen vor, so findet man Diacylierungen, es sei denn es werden Gegenmaßnahmen getroffen.

Beispielhaft für die enzymatische Acylierung der Kohlenhydrate seien zunächst die bahnbrechenden Arbeiten von Klivanov et al. genannt [Klivanov et al., 1986]. Sie setzten mit Hilfe von Schweinepankreas-Lipase Glucose und Trichlorethyl-laurat (1/3, w/w) in Pyridin mit 40 % Umsatz zu Glucose-6-laurat um. Colombo et al. [1999, 1998, 1998a] acylierten in Pyridin das bioaktive 2-O- β -D-Galactosylglycerin mittels *Pseudomonas cepacia* bzw. *Candida antarctica* Lipasen mit aktivierten Acylgruppen (2,2,2-Trifluorethyl-Ester) mittlerer Kohlenwasserstofflänge (C4 bis C10). Dabei konnten die jeweiligen 1-O-, 3-O-, 6'-O-acyl und die 1,6'-di-O-acylderivate erhalten werden, die alle Anti-Tumor-Promoter Aktivitäten (Inhibierung des EBV-EA) zeigten. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Länge der Acylketten bedeutender für die Anti-Tumor-Promoter Aktivität ist als die Position der Estergruppe bzw. die Natur des Zuckers. Die stärkste antitumorale Wirkung wurde durch die C6-Kette erzielt. Dieses Ergebnis ist ziemlich überraschend, da Glycoglycerolipide mit dieser Kettenlänge bisher in der Natur noch nicht gefunden werden konnten.

4.1 Enzymatische Hydrolyse des Glycoglycerolipids GGL11

Das Glycoglycerin GG11 konnte sowohl durch alkalische Verseifung als auch durch enzymatische Hydrolyse dargestellt werden. Dennoch erwies sich die enzymatische Darstellung als wesentlich vorteilhafter, da die biochemische Modifikation mit der Lipase aus *Candida antarctica* in tert-Amylalkohol ($H_2O < 1\%$) die Steuerung des Produktspektrums über die Reaktionsdauer gestattete. Durch den Einsatz der immobilisierten Lipase war es möglich, sowohl das Glycoglycerolipid GGL11a (einfach acyliert am C 2) als auch das Glycoglycerin GG11 zu erhalten. Die Hydrolyse zu GG11 verlief in zwei Stufen. Bereits nach 10 h war die Bildung des Zwischenprodukts GGL11a zu erkennen. Daraufhin setzte die Umsetzung des GGL11a zu GG11 ein (24 h). Nach 48 h war kein GGL11a mehr nachweisbar und die Ausbeute an GG11 betrug 84 %. Die enzymatische Hydrolyse von GGL11 war temperaturabhängig und das Optimum lag bei 55°C. Bei höheren Temperaturen (70°C) wurde zwar das Reaktionsgleichgewicht bereits nach 34 h erreicht, aber die Umsetzung betrug nur 75 %. Bei niedrigen Temperaturen (40°C) wurde zwar vollständige Umsetzung erzielt, aber bei einer verlängerten Reaktionsdauer um 24

auf 72 h (50 %). Die Steuerung des Produktspektrums über die Reaktionsdauer war möglich, weil sich auch bei dieser Reaktion zeigte, dass Lipasen bevorzugt die sn-1 Position hydrolysieren [Hara et al., 1997]. Ungewöhnlich für die vollständige Hydrolyse von GGL11 ist, dass sie nur in polaren organischen Lösemitteln (Wassergehalt < 1 %) wie tert-Amylalkohol bzw. Tetrahydrofuran durchführbar war. Bei größeren Wassergehalten oder gepufferten wässrigen Medien, die üblicherweise für enzymatische Hydrolysen verwendet werden, konnte keine Umsetzung beobachtet werden. Über ähnliche Erfahrungen, z. B. bei der vollständigen Entfernung von Fettsäuren aus Esterbindungen mittels *Candida rugosa* Lipase in organischen Lösemitteln wird in der Literatur berichtet [Inada, 1996]. Die Hydrolyse von Phospholipiden kann ebenfalls in organischen Lösemitteln durchgeführt werden. Dabei wurde die immobilisierte *Rhizomucor miehei* Lipase (Lipozyme) für die Hydrolyse von Phosphatidylcholin verwendet. Die besten Ausbeuten wurden in polaren organischen Lösemitteln wie Butanol oder tert-Amylalkohol erhalten [Haas et al., 1993].

Neben der selektiven Produktkontrolle ist vereinfachte Aufarbeitung als weiterer Vorteil der enzymatischen Hydrolyse zu nennen. Denn nach Abfiltration der Lipase konnte durch einfaches Abziehen des Lösemittels tert-Amylalkohol unter vermindertem Druck, anschließender Wiederaufnahme in dest. H₂O und n-Hexan, Abtrennung der wässrigen Phase mittels Scheidetrichter und nachfolgender Gefriertrocknung das Glycoglycerin GG11 erhalten werden.

4.2 Enzymatische Acylierung des Glycoglycerins GG11

Das Glycoglycerin GG11 konnte durch eine enzymatische Acylierung mit 4-Pentensäure in tert-Amylalkohol (Wassergehalt < 0.1 %) bei 50°C in das Glycoglycerolipid GGL12 (zweifach acyliert am C1 und C''6) umgesetzt werden. Ungewöhnlich an dieser Verbindung ist die kurze Fettsäure-Kettenlänge, die so in der Natur bei Glycoglycerolipiden bisher nicht nachgewiesen werden konnte [Colombo et al., 1998].

Bei der enzymatischen Acylierung handelte es sich um eine mehrstufige und temperaturabhängige Gleichgewichtsreaktion. Das einfach acylierte Zwischenprodukt GGL14 (C1) wurde sofort zum Hauptprodukt GGL12 umgesetzt. Hier wird wieder die Bevorzugung der primären Hydroxygruppen (C1 und C''6) durch Lipasen deutlich. Erst nachdem die beiden primären Hydroxygruppen in GG11 acyliert wurden, konnte eine geringe Umsetzung von GGL12 zu GGL13 (dreifach acyliert an C1, C2 und C''6) beobachtet werden. Dabei lag das Gleichgewicht immer weit auf der Seite des GGL12. Das Temperaturoptimum hinsichtlich der Produktbildung von GGL12 lag bei 40°C und einer Ausbeute von 88 % (72 h). Höhere Temperaturen verkürzten zwar die Reaktionszeit, verschlechterten aber gleichzeitig die Ausbeute an GGL12. Sie fiel auf 70 % (24 h).

Für die enzymatische Acylierung von GG11 waren nur die Lösemittel tert-Amylalkohol gut bzw. Pyridin und Tetrahydrofuran bedingt geeignet. Dieses Verhalten erklärt sich durch die geringe Solubilisierung des sehr polaren Glycoglycerins GG11. Nur in tert-Amylalkohol war GG11 vollständig löslich. In den Lösemitteln Pyridin und Tetrahydrofuran betrug die Löslichkeit noch mehr als 50 % (Löslichkeit in tert-Amylalkohol = 100 %), wobei alle weiteren getesteten Lösemittel teilweise weit unter 35 % lagen. Außerdem ist die Enzymaktivität in hydrophoben höher als in hydrophilen Solventien. Laane et al. [1987] fanden, dass eine direkte Korrelation zwischen der Aktivität und der Hydrophobie des Lösemittels, ausgedrückt als log P-Wert (wobei P der Verteilungskoeffizient des Lösemittels zwischen n-Octanol und Wasser ist), besteht. Da tert-Amylalkohol (log-P 1.3) hydrophober als Pyridin (log-P 0.71) und THF (log-P 0.49) ist und damit eine höhere Enzymaktivität aufweist und gleichzeitig die vollständige Löslichkeit des Glycoglycerins GG11 ermöglicht, sollte es auch das bessere Lösemittel für die enzymatische Acylierung von GG11 darstellen.

Bis auf die 4-Pentensäure konnte keine weitere der 15 getesteten Fettsäuren bzw. Fettsäureester vollständig mit GG11 umgesetzt werden. Zwar konnten die Fettsäuren bzw. deren Ester Linolsäure, Linolensäure, 10-Undecensäure, Monomethylpimelat und Methyl-5-Bromvalerat in tert-Amylalkohol teilweise umgesetzt werden, aber das Gleichgewicht lag dabei weit auf der Seite der Edukte (> 90 %). Aufgrund dieser geringen Ausbeuten konnte keine dieser Verbindungen NMR-spektroskopisch

aufgeklärt werden. Die erhaltenen R_F -Werte lassen aber den Schluss zu, dass es sich um die jeweiligen monoacylierten Glycoglycerolipide (C1) handeln sollte. Eine mögliche Ursache für die schlechte Umsetzungsrate der getesteten Verbindungen könnte in dem Wassergehalt der Lösemittel liegen. Denn der Wassergehalt eines Lösemittels ist für die Enzymaktivität von großer Bedeutung. Zum Erreichen einer hohen Enzymaktivität muss der Wassergehalt des Lösemittels umso höher sein, je hydrophiler das Lösungsmittel ist [Carrera et al., 2000]. Dies liegt daran, dass nicht der Wassergehalt des Lösungsmittels (W_S) für die Aktivität zählt, sondern der Wassergehalt des Enzyms (W_E). Daher ist der Einfluss organischer Lösemittel auf ein Enzym in erster Linie auf Wechselwirkungen mit der enzymgebundenen essentiellen Wasserschicht und nicht auf Wechselwirkungen mit dem Enzym selbst zurückzuführen. Für eine genauere Korrelation der Enzymaktivität mit der im Reaktionsmedium vorhandenen Wassermenge nutzten Halling [1994] und Goderis et al. [1987] die thermodynamische Wasseraktivität. Die Wasseraktivität a_W ist mit dem Molenbruch von Wasser (χ_W) über den Wasseraktivitätskoeffizienten γ_W gemäß $a_W = \chi_W \gamma_W$ korreliert. Da der Wasseraktivitätskoeffizient γ_W in erster Näherung mit der Lösemittelhydrophobie größer wird, ist offensichtlich, dass ein bestimmter Wert von a_W in einem hydrophoben Lösemittel bei einer niedrigeren Wasserkonzentration erreicht wird als in einem hydrophilen Medium. Daher ist, um das gleiche Maß an Hydratisierung, d.h. die gleiche Wasseraktivität a_W am Enzym zu erreichen, in einem hydrophoben Lösemittel weniger Wasser erforderlich als in einem hydrophilen. Das hat für das hydrophile Lösemittel tert-Amylalkohol zur Folge, dass die Enzymaktivität der Lipase aus *Candida antarctica* durch eine geringe Zunahme des Wassergehalts gesteigert werden könnte. Doch setzt sich bei höheren Wassergehalten in tert-Amylalkohol die Konkurrenzreaktion der enzymatischen Hydrolyse (V.1) durch. D.h. es findet verstärkt die Rückreaktion statt. Dies erklärt die schlechte Gleichgewichtslage der durchgeführten Reaktionen.

Mögliche Alternativen, um die Gleichgewichtslage bei der enzymatischen Acylierung von GG11 zu verbessern, sind

- heterogene Reaktionssysteme; denn kürzlich konnte gezeigt werden, dass die Lipasen-katalysierte Synthese von Zuckerlipiden in einem heterogenen Reaktionssystem in Gegenwart von nur kleinen Volumina organischer

Lösungsmittel (Aceton, tert-Butanol/n-Hexan, Tetrahydrofuran etc.) möglich ist [Haase et al., 1998; Aha et al., 1997].

- vorgeschaltete chemische Modifizierung des GG11; Lösung des Problems der geringen Solvatisierbarkeit des GG11 in hydrophoben Lösemitteln [Ward et al., 1997; Cordova et al., 1997; Andresen et al., 1995].
- Einsatz von aktivierten Fettsäuren; Darstellung und Umsetzung der 2,2,2-Trifluoroethylester der jeweiligen Fettsäuren [Colombo et al., 1998a].

5. Charakterisierung der physiko-chemischen Eigenschaften

Die Glycoglycerolipide GGL11 und GGL12 enthalten sowohl hydrophobe als auch hydrophile Bereiche im Molekül, weisen amphiphilen Charakter auf und sollten daher grenzflächenaktive Eigenschaften zeigen.

Werden solche grenzflächenaktiven Substanzen in Wasser gelöst, erfordert die Solvation des hydrophoben Molekülteiles einen hohen Energieaufwand zur Überwindung der Kohäsionskräfte zwischen den Wassermolekülen, während der hydrophile Molekülteil leicht unter Energiegewinn hydratisiert wird. Deshalb reichern sich die Tensidmoleküle an der Phasengrenzfläche an, so dass die hydrophilen Gruppen im Wasser bleiben, während die hydrophoben Reste in die angrenzende Gas- oder Flüssigkeitsphase hineinragen. Dadurch wird beispielsweise die Grenzflächenspannung verringert. Beim Überschreiten einer bestimmten Tensidkonzentration bilden sich im Innern einer Lösung Tensidaggregate, die Micellen, die ihrerseits wieder die Eigenschaften der Lösung beeinflussen können. Diese Konzentration wird als kritische Micellbildungskonzentration (CMC-Wert) bezeichnet. Sie ergibt für jedes Tensid einen charakteristischen Wert.

Die Reduktion der Oberflächen- und Grenzflächenspannung wurde für die Glycoglycerolipide GGL11 und GGL12 bestimmt. In Tabelle IV.5 sind die Ergebnisse im Vergleich mit anderen mikrobiell gewonnenen Biotensiden dargestellt. Bis auf das

GGL12 konnten alle Biotenside die Oberflächenspannung von Wasser von 72 mN/m auf unter die für Tenside relevante Grenze von 40 mN/m erniedrigen. Dies liegt an dem relativ geringen hydrophoben Anteil, bestehend aus den beiden Pentensäureresten, in GGL12. Zwar sind bei einkettigen Tensiden mit linearen Alkylketten erst Verbindungen mit einer Kohlenwasserstofflänge von 7 oder mehr Kohlenstoffatomen grenzflächenaktiv und zur Aggregation und Micellbildung fähig [Kosswig, 1982], doch die Kombination der beiden kurzen Ketten bewirkte die Grenzflächenaktivität von GGL12. Diese relativ schwache Grenzflächeneigenschaft von GGL12 im System Wasser/Luft wurde durch den relativ hohen Wert von 19 mN/m im System Wasser/n-Hexadecan bestätigt.

Tabelle IV.5: Minimale Oberflächenspannung σ_{OS} , Grenzflächenspannung γ_{GS} (Wasser/n-Hexadecan) und entsprechende CMC-Werte verschiedener Biotenside [Wicke et al., 2000; Vollbrecht et al., 1998].

| Mikroorganismus | Biotensid | σ_{OS} [mN/m] | γ_{GS} (mN/m) | CMC [mg/l] |
|--------------------------------------|-----------|----------------------|----------------------|------------|
| <i>Bacillus subtilis</i> | GGL11 | 29 | 5 | 50 |
| | GGL12* | 40 | 19 | 250 |
| <i>Microbacterium spec.</i> | GGL.2 | 33 | 5 | 200 |
| <i>Tsukamurella spec.</i> | GL2 | 23 | 4 | 100 |
| <i>Arthrobacter spec.</i> SI 1 | TL-2 | 36 | 17 | 4 |
| <i>Arthrobacter spec.</i> EK 1 | TL-4 | 26 | < 5 | 15 |
| <i>Pseudomonas spec.</i> DSM 2874 | R4 | 30 | < 1 | 200 |

* durch enzymatische Modifikation aus GGL11 dargestellt

Dagegen zeigte GGL11 mit einer Erniedrigung der Oberflächenspannung von Wasser von 72 auf 29 mN/m, einer kritischen Micellbildungskonzentration von 50 mg/l und einer Grenzflächenspannungsreduktion auf 5 mN/m (Wasser/n-Hexadecan) sehr gute Eigenschaften. Die deutlich besseren Tensideigenschaften von GGL11 im Vergleich zu GGL12 hängen mit dem vergrößerten hydrophoben Teil des Moleküls zusammen, da die lipophile Komponente die Oberflächeneigenschaft des Tensids bestimmt, während die hydrophile Gruppe das Verhalten des Tensids in wässriger Lösung, z.B. die Löslichkeit, beeinflusst. Nach der Traubeschen-Regel erniedrigt sich

in einer Reihe von homogenen Tensiden die kritische Micellbildungskonzentration und die minimale Oberflächenspannung mit zunehmender Größe des hydrophoben Restes. Zum einen beträgt die jeweilige Kettenlänge der beiden lipophilen Alkylreste 15 bzw. 17 Kohlenstoffatome und zum anderen sind diese beiden Ketten aufgrund ihrer Positionen am C1 und C2 des Glycerinrestes von GGL11 parallel angeordnet und wirken somit in eine Richtung.

Eine andere Charakterisierung von Tensiden beinhaltet ihr Emulgiervermögen. Grundsätzlich können alle Tenside auch als Emulgatoren verwendet werden. Die Wahl des Emulgators richtet sich dabei nach den zu emulgierenden Phasen und nach dem Anwendungszweck der Emulsion. Durch die Reduktion der Grenzflächenspannung an der Phasengrenzfläche Öl/Wasser wird die Zerteilung der inneren Phase in fein verteilte Tröpfchen und damit eine Vergrößerung der Oberfläche ermöglicht. Durch mechanische Vermischung entstehen zusätzliche Strömungen und Turbulenzen, die die Tröpfchenbildung unterstützen. Dabei beruht die Stabilisierung auf der Belegung der Grenzfläche mit Tensidmolekülen, die ein Koaleszieren der dispergierten Phase verhindern. Daher ist das Spreitungsvermögen eines Tensids wichtig für die Stabilität einer Emulsion. Beide Glycoglycerolipide spreiteten spontan auf der Oberfläche von Wasser, wobei wiederum GGL11 (ca. 30 sec) deutlich schneller spreitete als GGL12 (ca. 50 sec). Da die Spreitungsgeschwindigkeit der Emulgatormoleküle von deren sterischem Aufbau abhängen, kann die für die Emulsionsstabilisierung eher negative geringe Spreitungsgeschwindigkeit von GGL12 durch deren geringen Platzbedarf teilweise ausgeglichen werden.

Nach Griffin lässt sich das Emulgierverhalten eines Tensids anhand des Verhältnisses von hydrophilen und hydrophoben Molekülanteilen bestimmen. Dieses Verhältnis kann mit dem HLB-Wert (Hydrophilic Lipophilic Balance) beschrieben werden [Griffin, 1954]. Jedem Emulgator ist eine dimensionslose Zahl zwischen 0 und 20 zugeordnet. Tabelle IV.6 zeigt die Anwendungsgebiete der Emulgatoren in Abhängigkeit von ihrem HLB-Wert [Heusch, 1993]. Öllösliche hydrophobe Emulgatoren, deren hydrophober Anteil überwiegt, besitzen HLB-Werte unter 9, hydrophile wasserlösliche Tenside weisen dagegen Werte zwischen 11 und 20 auf. Bei einem Wert von 10 liegt das hydrophile-lipophile Gleichgewicht. Dort ist der

Emulgator zwischen beiden Phasen gleichmäßig verteilt, so dass sein hydrophober Teil in der Ölphase und sein hydrophiler in der wässrigen Phase orientiert ist. Im Idealfall, bei nichtionischen, unverzweigten und einkettigen Tensiden, lässt sich der HLB-Wert eines Emulgators berechnen (Gleichung (5) in II.9.10).

Tabelle IV.6: Anwendungsgebiete von nichtionischen Tensiden in Abhängigkeit vom HLB-Wert [Heusch, 1993].

| Anwendungsgebiet | HLB-Wert | Verhalten in Wasser |
|-------------------|----------|--------------------------------------|
| Entschäumer | 0-3 | nicht löslich |
| W/Ö-Emulsionen | 3-8 | nicht löslich, dispergierbar |
| Netzmittel | 7-9 | milchig dispergierbar |
| Ö/W-Emulsionen | 8-18 | milchig trüb bis transluzent löslich |
| Waschmittel | 11-15 | transluzent bis klar löslich |
| Lösungsvermittler | 15-18 | klar löslich |

Die experimentelle Bestimmung des HLB-Wertes für GGL12 wich von dem berechneten HLB-Wert (Tabelle IV.7) ab. GGL12 emulgiert Substrate optimal, die einen HLB-Wert von 13 aufweisen. Die Differenz der beiden Werte lässt sich durch die strukturellen Besonderheiten von GGL12 erklären. Eine Molekülstruktur mit zwei hydrophoben Resten, die zudem an unterschiedlichen Positionen wie in GGL12 sitzen (C1 bzw. C''6), widersprechen den gemachten Annahmen im Modell von Griffin. Daher sollte die theoretische HLB-Wert-Ermittlung für GGL12 nur als eine erste Näherung betrachtet werden und nicht mit dem experimentell gemessenen Wert übereinstimmen.

Tabelle IV.7: Vergleich der experimentellen und theoretischen HLB-Wert-Bestimmung.

| Glycoglycerolipid | HLB-Wert (berechnet) | HLB-Wert (gemessen) |
|-------------------|----------------------|---------------------|
| GGL11 | 10.1 | 10 |
| GGL12 | 14.7 | 13 |

Mit dem experimentell bestimmten HLB-Wert von 13 stabilisiert GGL12 Ö/W-Emulsionen und könnte eine Anwendung als Waschmittel finden. Das beobachtete Verhalten bei Zugabe von Wasser entsprach mit der Bildung einer klaren Dispersion dem erwarteten Ergebnis.

Dagegen verhielt sich GGL11 mit einem experimentell bestimmten HLB-Wert von 10 entsprechend dem theoretischen Modell von Griffin. Dieses auf den ersten Blick überraschende Ergebnis - die Molekülstruktur von GGL11 entspricht ebenfalls nicht dem idealen Verhalten nach Griffin - kann durch die beiden am C1 und C2 parallel angeordneten Kohlenwasserstoffketten erklärt werden. Dadurch wird das Molekül in zwei gleich große Bereiche, die hydrophil bzw. hydrophob sind, aufgeteilt und kann sich entsprechend dem Modell von Griffin an der Phasengrenzfläche anlagern. Daher stabilisiert GGL11 bevorzugt Ö/W-Emulsionen. Die mit n-Hexadecan, Kerosin und Mineralöl als hydrophobe Phasen durchgeführten Emulsionstests bestätigen, dass GGL11 bevorzugt Ö/W-Emulsionen mit Mineralöl (HLB-Wert von 10-12 [Heusch, 1993]) stabilisiert.

6. Biologische Aktivität

Glycolipide sind als Zellmembran- und Zellwandbestandteile sowohl in Bakterien, Pilzen, Algen und höheren Organismen vertreten. Sie sind zwar nur in relativ geringen Konzentrationen vorhanden, doch übernehmen sie eine wichtige Funktion bei zellulären Interaktionen, wie z.B. bei der Regulation von Zellwachstum, Adhäsion und Zelldifferenzierung.

In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, dass die Substanzklasse der Glycoglycerolipide zahlreiche interessante bioaktive Eigenschaften aufweisen. Beispielsweise inhibiert ein sulfatiertes Glycoglycerolipid, 1-O-(6'-sulfo- α -D-glucopyranosyl)-2,3-di-O-phytanyl-sn-glycerin (KN-208), die DNA-Polymerasen α , β , die *Escherichia coli* DNA-Polymerase I und die HIV- Reverse Transkriptase [Ogawa

et al., 1998]. Das aus *Microbacterium* spec. isolierte Glycoglycerolipid M874B [1,2-di-O-(12-methyltetradecanoyl)-3-O- β -D-galactopyranosyl-sn-glycerin] schützt vor dem durch tert-Butylhydroperoxid, Wärme und Hydrogenperoxid induzierten Zelltod [Matsufuji et al., 2000; Matsufuji et al., 2000a]. Daher kann das Glycoglycerolipid M874B als ein einzigartiger Sauerstoffradikalfänger angesehen werden [Matsufuji et al., 2000b]. Außerdem ist aus zahlreichen Veröffentlichungen bekannt, dass Glycoglycerolipide aus dem Cyanobakterium *Phormidium tenue* [Shirahashi et al., 1993], aus *Citrus hystrix*, einem thailändischen Heilkraut [Murakami et al., 1995] oder aus der Grünalge *Chlorella vulgaris* [Morimoto et al., 1995] als Anti-Tumor-Promoter wirken. Da die Tumor-Promotion als einziger Schritt der Cancerogenese reversibel ist [Hennings et al., 1993], stellt die Suche nach Naturstoffen, die die Tumorentstehung unterdrücken, ein erfolgsversprechendes Gebiet der Krebsprävention dar [Wattenberg et al., 1993; Greenwald et al., 1990].

In diesem Zusammenhang wurden sowohl die innerhalb dieser Arbeit dargestellten Glycoglycerolipide GGL11, GGL11a, GGL12 als auch das Glycoglycerin GG11 auf biologische Aktivitäten getestet.

Nur das Glycoglycerin GG11 zeigte antimikrobielle Wirkung gegenüber dem grampositiven Bakterium *Bacillus megaterium* und dem Pilz *Ustilago violacea*. Dabei konnten IC₅₀-Werte von 100 µg/ml (*Bacillus megaterium*) bzw. 150 µg/ml (*Ustilago violacea*) ermittelt werden. Ein Vergleich mit den Literaturwerten zeigt, dass die antimikrobielle Wirkung von GG11 gering ist. Beispielsweise besitzt Thiomarinol D aus *Alteromonas rava* einen IC₅₀-Wert von weniger als 0.01 µg/ml gegenüber dem grampositiven Bakterium *Staphylococcus aureus* [Shiozawa et al., 1997].

Im Neuroprotektionstest konnte keine Aktivität festgestellt werden. Der gemessene GI₅₀-Wert von > 10 µg/ml für GGL11 im MTT- Zytotoxizitätstest gegen die Tumorzelllinie L 5178Y liegt oberhalb der für eine pharmakologische Anwendung relevanten Grenze von 10 µg/ml.

Die Substanzen GGL11a und GG11 zeigten in den Zytotoxizitätstests gegen die Tumorzelllinien HM02 (Magencarcinom) und HEP-G2 (Lebercarcinom) deutliche Wirkungen. Die GI₅₀-Werte lagen für GGL11a bei 0.32 µmol/l (HM02) bzw. 2.2 µmol/l

(HEP-G2) und für GG11 bei 2.1 $\mu\text{mol/l}$ (HM02) bzw. 3.3 $\mu\text{mol/l}$ (HEP-G2). Diese Wirkungen liegen im Bereich der Standardzytostatika Doxorubicin, Cisplatin und 5-Fluoruracil, die GI_{50} -Werte zwischen 0.05 und 0.5 $\mu\text{mol/l}$ aufweisen. Besonders hervorzuheben ist dabei die hohe zytostatische Wirkung des Glycoglycerolipids GGL11a gegenüber der Magencarcinomzelllinie HM02, deren Aktivität derjenigen von Standardzytostatika vergleichbar ist. Daher erscheinen weiterführende Untersuchungen mit GGL11a, um das pharmakologische Potenzial dieser Verbindung nachzuweisen, besonders erfolgsversprechend. Da die klassischen Chemotherapeutika die Tumorzellen letztendlich durch eine Induktion der Apoptose abtöten, wäre es auch für GGL11a interessant, die Wirkungsweise abzuklären. Da Zytostatika phasenspezifisch in das Wachstum von Tumorzellen eingreifen, wäre es eine Möglichkeit, die Wirkungsweise über Zellzyklusuntersuchungen aufzuklären. Von großem Interesse für die weiteren Forschungen an den Glycoglycerolipiden wäre es auch, zu untersuchen, welche Teilstrukturen der Glycoglycerolipide letztendlich die zytotoxische Wirkung entfalten. Denn dann könnte durch gezielte chemische oder enzymatische Modifikation die Wirksamkeit der Glycoglycerolipide erhöht werden. Aus den bisherigen Testergebnissen kann abgeleitet werden, dass die Anzahl und die Art der Fettsäurereste von entscheidender Bedeutung für die zytotoxische Wirkung ist. Zweifach acylierte Glycoglycerolipide scheinen generell keine signifikanten Wirkungen zu zeigen, wie die Ergebnisse von GGL11 und GGL12 nahelegen. Dabei scheinen auch die Acylierungspositionen, ob Zuckereinheit oder Glycerineinheit, eine untergeordnete Rolle zu spielen. Einfach acylierte Glycoglycerolipide zeigen wahrscheinlich bessere Aktivitäten als die vollständig hydrolysierten Glycoglycerine. Dieser Zusammenhang müsste aber durch weitere Untersuchungen untermauert werden.

Ein weiteres positives Ergebnis ergab die Untersuchung auf Anti-Tumor-Promoting-Aktivität durch Inhibierung der durch TPA induzierten Aktivierung eines frühen Antigens des Epstein-Barr-Virus (EBV-EA). Alle eingesetzten Verbindungen (Tabelle III.17) inhibierten das EBV-EA und verhinderten damit die Aktivierung der Viren und das Absterben der Testzelllinie. Die höchste antitumorale Aktivität wies das Glycoglycerin GG11 auf. Gleichzeitig wiesen alle eingesetzten Substanzen Überlebensraten der Raji-Zellen (EBV-Genom tragende menschliche lymphoblastische Zellen) von 60 bis 80 % auf. Dieser Zusammenhang ist von

entscheidender Bedeutung, da für den therapeutischen Einsatz einer Substanz neben der eindeutigen Wirksamkeit auch eine gute Verträglichkeit erforderlich ist. Die Struktur der Glycolipide bzw. Glycoglycerine hat einen entscheidenden Einfluss auf die antitumorale Wirkung. Dabei scheint die Glycerineinheit von besonderer Bedeutung zu sein. Der Trend, dass Glycoglycerine verglichen mit den entsprechenden Glycoglycerolipiden eine deutlich stärkere Inhibierung zeigen [Colombo et al., 1996], konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden.

Da die in dieser Arbeit dargestellten Verbindungen vielversprechende zytostatische und Anti-Tumor-Promoting-Aktivitäten zeigten, ist geplant, durch die gezielte enzymatische Modifikation verschiedener mikrobieller Glycoglycerolipide, neuartige und in ihrer Bioaktivität optimierte Verbindungen darzustellen.

V Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit befasste sich mit der Isolierung und Charakterisierung biologisch aktiver Naturstoffe aus marinen schwammassoziierten Bakterien und den daraus durch enzymatische Modifikation dargestellten neuartigen Verbindungen. Als Quelle für die mikrobiellen Isolate wurde der marine Schwamm *Acanthella acuta*, der aus der Ägäis vor der Küste Kretas (Litoral) geerntet wurde, gewählt. Es konnten auf dem Komplexmedium Marine Broth 16 verschiedene Bakterien isoliert werden. Die Einzelisolate wurden in einem Screening auf antimikrobiell wirkende und chemisch ungewöhnliche Metabolite untersucht.

In diesem Zusammenhang wurden die mikrobiellen marinen Isolate *Psychroflexus* spec. nov. (AAS12) und *Bacillus subtilis* (AAS3) hinsichtlich des Einflusses der Mediumszusammensetzung und der äußeren Kultivierungsparameter Temperatur, pH und Sauerstoffeintrag auf das Wachstum und die Produktion mehrerer Metabolite untersucht und optimiert. Da das Isolat AAS3 nur zu 97 % (16S rDNA Sequenzanalyse) mit der Art *Bacillus subtilis* übereinstimmt, könnte es gerechtfertigt sein, von einer neuen Spezies *Bacillus* spec. AAS3 auszugehen.

Es konnte gezeigt werden, dass *Psychroflexus* spec. nov. das intrazellulär gebildete Carotenoid Caloxanthin, das für Cyanobakterien und die aeroben phototrophen Bakterien (α 4-Subklasse) charakteristisch ist, mit einer Ausbeute von 0.1 mg/l bildete. Optimale Kultivierungsbedingungen im 50 l Bioreaktor bezüglich des Wachstums und der Caloxanthinproduktion ergaben sich bei Verwendung des Komplexmediums Marine Broth, supplementiert mit 10 g/l Hefeextrakt und 3 g/l Pepton als zusätzliche Kohlenstoffquellen und bei einer Inkubationstemperatur von 23 °C.

Aus dem Zellextrakt von *Bacillus subtilis* (*Bacillus* spec. AAS3) konnte das Glycoglycerolipid 1,2-O-diacyl-3-[[β -glucopyranosyl-(1-6)- β -glucopyranosyl]]-glycerin (GGL11) isoliert werden. Charakteristisch für GGL11 war der bevorzugte Einbau der gesättigten anteiso-Fettsäuren 12-Methyl-Tetradecansäure und 14-Methyl-Hexadecansäure, die charakteristisch für die Diglucosylglycerolipide in den Zellmembranenwänden der Gattungen *Bacillus*, *Staphylococcus* und *Microbacterium*

sind. Die maximal erreichbare Konzentration an GGL11 konnte um mehr als das Dreifache auf 91 mg/l gesteigert werden. Die optimalen Kultivierungsbedingungen im 50 l Bioreaktor bezüglich des Wachstums und der GGL11-Bildung bestanden aus dem Synthetischen Meerwassermedium SM1, mit 20 g/l Glucose als Kohlenstoffquelle und 10 g/l Hefeextrakt als zusätzlichem komplexen Bestandteil, 5 g/l Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle, 0.89 g/l Na₂HPO₄ als Phosphatquelle und einer Inkubationstemperatur von 30 °C.

Durch enzymatische Modifikationen konnten aus GGL11 die neuartigen Glycoglycerolipide GGL11a, GGL12, GGL13 und GGL14 bzw. das Glycoglycerin GG11 dargestellt werden. Bei der enzymatischen Hydrolyse des GGL11 zu GGL11a und GG11 konnte die Produktbildung über die Reaktionszeit gesteuert werden. Die Hydrolyse zu GG11 verlief in zwei Stufen. Bereits nach 10 h war die Bildung des Zwischenprodukts GGL11a zu erkennen. Daraufhin setzte die Umsetzung des GGL11a zu GG11 ein (24 h). Nach 48 h war kein GGL11a mehr nachweisbar. Die Ausbeute an GG11 betrug 84 %. Die optimalen Reaktionsbedingungen für die enzymatische Hydrolyse bestanden aus:

| | |
|----------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <i>Glycoglycerolipid (GGL11)</i> | <i>0.5 mmol</i> |
| <i>Enzym</i> | <i>200 mg Novozym Lipase 435 aus Candida antarctica</i> |
| <i>Lösungsmittel</i> | <i>20 ml tert-Amylalkohol (Wassergehalt < 1 %)</i> |
| <i>Temperatur</i> | <i>55 °C</i> |
| <i>Reaktionsdauer</i> | <i>24-48 h</i> |

Bei der enzymatischen Acylierung des GG11 mit 4-Pentensäure wurde das Hauptprodukt GGL12 (zweifach acyliertes Glycoglycerolipid) und das Nebenprodukt GGL13 (dreifach acyliert) und das Zwischenprodukt GGL14 (einfach acyliert) gebildet. Die Ausbeute an GGL12 betrug 88 %. Die optimalen Reaktionsbedingungen für die enzymatische Acylierung bestanden aus:

| | |
|-----------------------------|---------------------------------------------------------|
| <i>Glycoglycerin (GG11)</i> | <i>0.15 mmol</i> |
| <i>4-Pentensäure</i> | <i>0.45 mmol</i> |
| <i>Enzym</i> | <i>100 mg Novozym Lipase 435 aus Candida antarctica</i> |
| <i>Lösungsmittel</i> | <i>20 ml tert-Amylalkohol (Wassergehalt < 0.1 %)</i> |

| | |
|-------------------------|----------------------------|
| <i>Trocknungsmittel</i> | <i>aktiviertes Molsieb</i> |
| <i>Temperatur</i> | <i>40 °C</i> |
| <i>Reaktionsdauer</i> | <i>72 h</i> |

Physiko-chemische Untersuchungen von GGL11 und GGL12 zeigten, dass die Glycoglycerolipide gute oberflächen- und grenzflächenaktive Eigenschaften besitzen. Dabei wurden mit GGL11 bessere Werte erzielt: Die Oberflächenspannung von Wasser wurde von 72 mN/m auf 29 mN/m erniedrigt und die Grenzflächenspannung von Wasser/Hexadecan konnte bis auf 5 mN/m abgesenkt werden. Ein experimentell bestimmter HLB-Wert von 10, der gleich dem theoretisch ermittelten HLB-Wert war, für GGL11 sowie das Spreitungsverhalten auf der Oberfläche von Wasser zeigten, dass GGL11 gute Voraussetzungen für eine Verwendung als Emulgator besitzt. Dabei stabilisiert GGL11 bevorzugt Ö/W-Emulsionen.

Das Glycoglycerin GG11 besitzt antimikrobielle Wirkung gegen das grampositive Bakterium *Bacillus megaterium* und den Pilz *Ustilago violacea*. Die dargestellten Verbindungen GGL11a und GG11 zeigten in den Zytotoxizitätstests gegen die Tumorzelllinien HM02 (Magencarcinom) und HEP-G2 (Lebercarcinom) signifikante Aktivitäten. Dabei lag der GI₅₀-Wert für GGL11a bei 0.32 µmol/l (HM02) und ist damit denen klassischer Chemotherapeutika vergleichbar. Außerdem zeigten die Glycoglycerolipide GGL11, GGL11a, GGL12 und das Glycoglycerin GG11 hohe Anti-Tumor-Promoting-Aktivität.

VI Literatur

Adamson, A. W. (1982): Physical Chemistry of Surfaces, 4. Auflage, J. Wiley & Sons, New York, pp 185-187

Aha, B., Berger, M., Haase, B., Hermann, J., Keil, O., Machmüller, G., Müller, S., Waldinger, C., Schneider, M. (1997): Tenside aus nachwachsenden Rohstoffen. In: Chemie nachwachsender Rohstoffe, Österr. Bundesministerium für Umwelt, Jugend und Familie, Radinger, Scheibbs, pp 66-78

Andresen, O., Kirk, O. (1995): Fatty Acid Esters of Ethyl Glucoside, a Unique Class of Surfactants. In: Progress in Biotechnology, Proceedings, Vol. **10**, 343-349, Elsevier, Amsterdam

Anthony, W. L. (1963): Separation of Equol from Oestrogens by Thin-Layer Chromatography, *J. Chromatog.*, **13**, 570-572

Baumann, P., Moran, N. A. (1997): Non-cultivable Microorganisms from Symbiotic Associations of Insects and other Hosts, *Antonie van Leeuwenhoek*, **72**, 39-48

Benning, C., Huang, Z. H., Gage, D. A. (1995): Accumulation of a Novel Glycolipid and a Betain Lipid in Cells of *Rhodobacter sphaeroides* Grown under Phosphate Limitation, *Arch. Biochem. Biophys.*, **317**, 103-111

Bernan, V. S., Greenstein, M., Maiese, W. M. (1997): Marine Microorganisms as a Source of New Natural Products, *Adv. Appl. Microbiol.*, **43**, 57-90

Besson, F. (1994): Characterization of the Surfactin Synthetase Isolated from the *Bacillus subtilis* Strain in Producing Iturin, *Biotech. Lett.*, **16**, 1269-1274

Bewley, C. A., Faulkner, D. J. (1998): Steinschwämme: Stars unter den Naturstoffproduzenten oder Wirte der Stars?, *Angew. Chem.*, **110**, 2280-2297

Bindseil, K. U. (1996): Naturstoffchemie. Neue Wirkstoffe - Neue Mechanismen, *BIOforum*, **9**, 369-372

Borowitzka, M. A. (1999): Commercial Production of Microalgae: Ponds, Tanks, Tubes and Fermenters, *J. Biotechnol.*, **70**, 313-321

Bowman, J. P., McCammon, S. A., Lewis, T., Skerratt, J. H., Brown, J. L., Nichols, D. S., McMeekin, T. A. (1998): *Psychroflexus gondwanense* gen. nov., sp. nov., a Psychrophilic Species from Antarctic Sea Ice and Reclassification of *Flavobacterium gondwanense* (Dobson *et al.* 1993) as *Psychroflexus gondwanense* gen. nov., comb. nov. *Microbiology*, **144**, 1601-1609

Bornscheuer, U. T., Kazlauskas, R. J. (1999): Hydrolases in Organic Synthesis - Regio- and Stereoselective Biotransformations, Wiley-VCH, Weinheim, pp 177-182

Bowman, J. P., McCammon, S. A., Lewis, T., Skerratt, J. H., Brown, J. L., Nichols, D. S., McMeekin, T. A. (1999): *Psychroflexus torquis* gen. nov., sp. nov., a psychrophilic species from Antarctic sea ice, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **49**, 1-3

Bradford, M. M. (1976): A Papid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254

Brundish, D. E., Baddiley, J. (1968): Synthesis of Glucosylglycerols and Diglucosylglycerol and their Identification in Small Amounts, *Carbohydr. Res.*, **8**, 308

Button, D., Hemmings, N. L. (1976): Lipoteichoic Acid from *Bacillus licheniformis* 6346 MH-1. Comparative Studies on the Lipid Portion of the Lipoteichoic Acid and the Membrane Glycolipid, *Biochemistry*, **15**, 989

Canedo, L. M., Fernandez Puentes, J. L., Perez Baz, J. (1997): PM-94128, a New Isocoumarin Antitumor Agent Produced by a Marine Bacterium, *J. Antibiot.*, **50**, 175-176

Carrera, G., Riva, G. (2000): Enzyme in organischen Lösungsmitteln: Eigenschaften und Einsatz in der Synthese, *Angew. Chem.*, **112**, 2312-2341

Collins, M. D., Jones, D., Keddle, R. M., Kroppenstedt, R. M., Schleifer, K. H. (1983): Classification of some Coryneform Bacteria in a New Genus, *System. Appl. Microbiol.*, **4**, 236-252

Colombo, D., Scala, A., Taino, I., Toma, L., Ronchetti, F., Tokuda, H., Nishino, H., Nagatsu, A., Sakakibara, J. (1996): 1-O-, 2-O- and 3-O- β -Glycosyl-sn-Glycerol: Structure-Anti-Tumor-Promoting Activity Relationship, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **6**, 1187-1190

Colombo, D., Compostella, F., Ronchetti, F., Scala, A., Toma, L., Mukainaka, T., Nagatsu, A., Konoshima, T., Tokuda, H., Nishino, H. (1996): Inhibitory Effects of Monoacylated 2-O- β -galactosylglycerol on Epstein-Barr Virus Activation: The Significant Role of the Hexanoyl Chain, *Cancer Letters*, **143**, 1-4

Colombo, D., Scala, A., Taino, I., Toma, L., Ronchetti, F., Tokuda, H., Nishino, H., Nagatsu, A., Sakakibara, J. (1998): Inhibitory Effects of Fatty Acid Monoesters of 2-O- β -D-Glucosylglycerol on Epstein-Barr Virus Activation, *Cancer Letters*, **123**, 83-86

Colombo, D., Ronchetti, F., Scala, A., Toma, L. (1998a): Bioactive Glycoglycerolipid Analogues: An Expeditious Enzymatic Approach to Mono- and Diesters of 2-O- β -D-galactosylglycerol, *Tetrahedron Asymmetry*, **9**, 2113-2119

Cordova, A., Hult, K., Iversen, T. (1997): Esterification of Methyl Glycoside Mixtures by Lipase Catalysis, *Biotechnol. Lett.*, **19**, 15-18

DeLong, E. F. (1997): Marine Microbial Diversity: The Tip of the Iceberg, *Trends Biotechnol.*, **15**, 203-207

De Vries, D. J., Hall, M. R. (1994): Marine Biodiversity as a Source of Chemical Diversity, *Drug Development Research*, **33**, 161-173

Dittmann, J., Wenger, R. M., Kleinkauf, H., Lawen, A. (1994): Mechanism of Cyclosporin A Biosynthesis, *J. Biol. Chem.*, **269**, 2841-2846

Dobson, S. J., Colwell, R. R., McMeekin, T. A., Franzmann, P. D. (1993): Direct Sequencing of the Polymerase Chain Reaction-Amplified 16S rRNA Gene of *Flavobacterium gondwanense* sp. nov. and *Flavobacterium salgenes* sp. nov., Two new Species from a Hypersaline Antarctic Lake, *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 77–83

Dolej, S. (1998): Wirkungen von Stoffwechselprodukten des Rhizobakteriums *Bacillus subtilis* (Ehrenberg) Cohn im Pathosystem Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) - *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-lycopersici* Jarvis & Shoemaker, Dissertation an der Humboldt-Universität Berlin

Dudzinski, A. E. (1967): 2',7'-Dichlorfluorescein-Aluminiumchlorid-Eisen(III)-chlorid, Spezifischer Nachweis für freie Fettsäuren, *J. Chromatog.*, **31**, 560

Falch, B. S., König, G. M., Sticher, O., Wright, A. D. (1995): Studies on the Glycolipid Content of the Canobacterium *Fischerella ambigua*, *Planta Med.*, **61**, 540-543

Faulkner, D. J. (2000): Highlights of Marine Natural Products Chemistry (1972-1979), *Nat. Prod. Rep.*, **17**, 1-6

Faulkner, D. J. (2000a): Marine Natural Products, *Nat. Prod. Rep.*, **17**, 7-55

Faulkner, D. J. (2000b): Marine Pharmacology, *Antonie van Leeuwenhoek*, **77**, 135-145

Fawcett, J. K., Scott, J. E. (1960): A Rapid and Precise Method for the Determination of Urea, *J. Clin. Path.*, **13**, 156

Fenical, W. (1993): Chemical Studies of Marine Bacteria: Developing a New Resource, *Chem. Rev.*, **93**, 1673-1683

Ferguson, R. L., Buckley, E. N., Palumbo, A. V. (1984): Response of Marine Bacterioplankton to Differential Filtration and Confinement, *Appl. Environ. Microbiol.*, **47**, 49-55

Fischer, W., Laine, A. R., Nakano, M. (1978): On the Relation between Glycerophosphoglycolipids and Lipoteichoic Acids in Gram-positive Bacteria. I. The Occurrence of Phosphoglycolipids, *Biochim. Biophys. Acta*, **528**, 298

Fisher, S. H. (1999): Regulation of Nitrogen Metabolism in *Bacillus subtilis*: Vive la Difference!, *Mol. Microbiol.*, **32**, 223-232

Fox, S. L., Bala, G. A. (2000): Production of Surfactant from *Bacillus subtilis* ATCC 21332 Using Potato Substrates, *Bioresource Biotechnology*, **75**, 235-240

Frank, H. A., Young, A. J., Britton, G., Cogdell, R. J. (1999): The Photochemistry of Carotenoids, 1. Auflage, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Frautz, B. (1986): Bildung und Charakterisierung von Glykolipiden bei *Ustilago maydis* ATCC 14826 in Abhängigkeit vom Substrat, Dissertation an der TU Braunschweig

Fusetani, N., Matsunaga, S. (1993): Bioactive Peptides from Marine Sponges, *Chem. Rev.*, **93**, 1793-1806

Fusetani, N., Okino, T., Yoshimura, E., Hirota, H. (1996): Antifouling Kalihinenes from the Marine Sponge *Acanthella cavernosa*, *Tetrahedr. Lett.*, **36**, 8637-8640

Goderis, H. L., Ampe, G., Feyten, M. P., Fouwe, B. L., Guffens, W. M., Van Cauwenbergh, S. M., Tobback, P. P. (1987): *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 2568-266

Göbbert, U., Schmeichel, A., Lang, S., Wagner, F. (1988): Microbial Transesterification of Sugar-Corynemycolates, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **65**, 1519-1525

Greenwald, P., Nixon, D. W., Malone, W. F., Kellof, G. J., Stern, H. R., Witkin, K. M. (1990): *Cancer*, **65**, 1483-1490

Griffin, W. C. (1954): Classification of Surface-Active Agents by "HLB", *J. Soc. Cosmet Chem.*, **5**, 249

Haase, B., Machmüller, G., Schneider, M. P. (1998): Enzymatische Synthesen von Zuckerestern. Biokonversion nachwachsender Rohstoffe, Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V.

Haas, M. J., Cichowicz, D. J., Phillips, J., Moreau, R. (1993): The Hydrolysis of Phosphatidylcholine by an Immobilized Lipase: Optimization of Hydrolysis in Organic Solvents, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **70**, 111-117

Halling, P. C., (1994): *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 178-206

Hara, F., Nakashima, T., Fukuda, H. (1997): Comparative Study of Commercially Available Lipases in Hydrolysis Reaction of Phosphatidylcholine, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 1129-1132

Hatton, P. V., Kinderleder, J. L. (1991): Toxicity of Medium Chain Fatty Acids to *Penicillium crustosum* and their Detoxification to Methyl Ketones, *J. Appl. Bacteriol.*, **70**, 401-407

Hennings, H., Glick, A. B., Greenhalgh, D. A., Morgan, D. L., Strickland, J. E., Tennenbaum, T., Yuspa, S. H. (1993): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1-18

Heusch, R. (1993): Grundlagen zur Emulgierwirkung von Tensiden, Die Tenside, Carl Hanser Verlag, München

Hilton, M. D., Alaeddinoglu, N. G., Demain, A. L. (1988): Synthesis of Bacilysin by *Bacillus subtilis* Branches from Prephenate of the Aromatic Amino Acid Pathway, *J. Bacteriol.*, **170**, 482-484

Hiramoto, M., Okada, K., Nagai, S. (1970): The Revised Structure of Viscosin, a Peptide Antibiotic, *Tetrahedron Lett.*, **13**, 1087-1900

Hünners, M. (1999): Naturstoffscreening und Bioprozeßoptimierung der Wirkstoffproduktion eines marinen schwammassoziierten Bakteriums, Dissertation an der TU Braunschweig

Imai, Y., Sugino, H., Fujita, T., Kakinuma, A. (1971): Hypocholesterolemic Effect of Surfactin, a Novel Bacterial Peptidelipid, *Takeda. Res. Lab.*, **30**, 728-734

Inada, Y. (1996): Manufacture of Glycerophosphorylcholine from Phosphatidylcholine with Modified Lipase, Japanese Patent, JP 63105685 A2 880510

Jacin, H. (1965): Separation of Carbohydrates on Borate-Impregnated Silicia Gel G Plates, *J. Chromatog.*, **18**, 170-173

Jayatilake, G. S., Thornton, M. P., Leonard, A. C., Grimwade, J. E., Baker, B. J. (1996): Metabolites from an Antarctic Sponge-Associated Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*, *J. Nat. Prod.*, **59**, 293-296

Jensen, P. R., Kauffman, C., Fenical, W. (1996): High Recovery of Culturable Bacteria from the Surfaces of Marine Algae, *Mar. Biol.*, **126**, 1-7

Jensen, P. R., Fenical, W. (1996): Marine Bacterial Diversity as a Resource for Novel Bioproducts, *J. Ind. Microbiol.*, **17**, 346-351

Jiang, Z. D., Jensen, P. R., Fenical, W. (1997): Actinoflavoside, A Novel Flavonoide-Like Glycoside Produced by a Marine Bacterium of the Genus *Streptomyces*. *Tetrahedr. Lett.*, **38**, 5065-5068

Kameda, Y., Matsui, K., Kato, H., Yamada, T., Sagai, H. (1972): Antitumor Activity of *Bacillus natto*. III. Isolation and Characterization of a Cytolytic Substance on Ehrlich Ascites Carcinoma Cells in the Culture Medium of *Bacillus natto* KMD 1126, *Chem. Pharm. Bull.*, **20**, 1551-1557

Kameda, Y., Ouhira, S., Matsui, K., Kanamoto, S., Hase, T., Atsusaka, T. (1974): Antitumor Activity of *Bacillus natto*. V. Isolation of Surfactin in the Medium of *Bacillus natto* KMD 2311, *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 938-944

Kates, M. (1990): Handbook of Lipid Research. 6. Glycolipids, Phosphoglycolipids and Sulfoglycoglycerolipids of Bacteria, 1. Auflage, Plenum Press, New York

Kerr, R., Kerr, S. (1999): Marine Natural Products as Therapeutic agents, *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, **9**, 1207-1222

Klibanov, A. M., Therisod, M. (1986): Facile Enzymatic Preparation of Monoacylated Sugars in Pyridine, *J. Am. Chem. Soc.*, **108**, 5638-5640 and **109**, 3977-3981

Knott, A. G.; Russel, A. D., Dancer, B. N. (1995): Development of Resistance to Biocides during Sporulation of *Bacillus subtilis*, *J. Appl. Bacteriol.*, **79**, 492-498

Kobayashi, J., Ishibashi, M. (1993): Bioactive Metabolites of Symbiotic Marine Microorganisms, *Chem. Rev.*, **93**, 1753-1769

Komaratat, P., Kates, M. (1975): The Lipids of a Halotolerant Species of *Staphylococcus epidermis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **398**, 464

Kosswig, K. (1982): Tenside. Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, 4. Auflage, Band 22, Verlag Chemie, Weinheim

Laane, C., Boeren, S., Vos, K., Veeger, C. (1987): *Biotechnol. Bioeng.*, **30**, 81-87

Landy, M., Warren, G. H., Roseman, S. P., Colio, L. G. (1948): Bacillomycin: An Antibiotic from *Bacillus subtilis* Active Against Pathogenic Fungi, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **67**, 539-541

Lang, D. R., Lundgren, D. G. (1970): Lipid Components of *Bacillus cereus* during Growth and Sporulation, *J. Bacteriol.*, **101**, 483

Liaeen-Jensen, S. (1990): Marine Carotenoids - Selected Topics, *New J. Chem.*, **14**, 747-759

Loeffler, W., Kremer, S., Kugler, M., Petersen, F., Jung, G., Rapp, C., Tschen, J. S.-M. (1990):): Gegen Pilze wirksame Antibiotika der *Bacillus subtilis* - Gruppe, *Forum Mikrobiol.*, **13**, 156-163

Lokotsch, W. (1994): Biokatalytische Synthese und physiko-chemische Charakterisierung von ungewöhnlichen Wachsestern, Dissertation an der TU Braunschweig

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275

Lund, B. M., Kinderleder, J. L. (1992): Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Hexanoic and Octanoic Acids, *Lett. Appl. Microbiol.*, **14**, 271-274

Mancini, I., Guella, G., Amade, P., Roussakis, C., Pietra, F. (1997): Hanishin, a Semiracemic, Bioactive C₉ Alkaloid of the Axinellid Sponge *Acanthella carteri* from the Hanish Islands, *Tetrahedr. Lett.*, **38**, 6271-6274

Mancini, I., Guella, G., Defant, A., Candenas, M. L., Armesto, C. P., Depenori, D., Pietra, F. (1998): Polar Metabolites of the Tropical Green Seaweed *Caulerpa taxifolia* Which is Spreading in the Mediterranean Sea: Glycoglycerolipids and Stable Enols (α -Keto Esters), *Helv. Chim. Acta*, **81**, 1681-1691

Mathews-Roth, M. M. (1991): Recent Progress in the Medical Application of Carotenoids, *Pure & Appl. Chem.*, **63**, 147-156

Matsufuji, M., Taguchi, K., Inagaki, M., Higuchi, R., Ohta, S., Yoshimoto, A (2000): Glycoglycerolipids Preventing *tert*-Butylhydroperoxide-Induced Cell Death from *Microbacterium spec.* and *Corynebacterium aquaticum* strains, *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 170-175

Matsufuji, M., Nagamatsu, Y., Yoshimoto, A (2000a): Protective Effects of Bacterial Glycoglycerolipid M874B Against Cell Death Caused by Exposure to Heat and Hydrogen Peroxide, *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 346-350

Matsufuji, M., Nagamatsu, Y., Yoshimoto, A (2000b): Effects of Bacterial Glycoglycerolipid M874B on Growth and TPA-Induced Differentiation of HL60 Cells, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1302-1304

Miki, W. (1991): Biological Functions and Activities of Animal Carotenoids, *Pure & Appl. Chem.*, **63**, 141-146

Miki, W., Otaki, N., Yokoyama, A., Izumida, H., Shimidzu, N. (1994): Okadaxanthin, a Novel C₅₀-Carotenoid from a Bacterium, *Pseudomonas* sp. KK10206C Associated with a Marine Sponge, *Halichondria okadai*, *Experientia*, **50**, 684-686

Miki, W., Otaki, N., Yokoyama, A., Kusumi, T. (1996): Possible origin of Zeaxanthin in the Marine Sponge, *Reniera japonica*, *Experientia*, **52**, 93-96

Miyaoka, H., Shimomura, M., Kimura, H., Yamada, Y. (1998): Antimalarial Activity of Kalihinol A and New Relative Diterpenoids from the Okinawan Sponge *Acanthella cavernosa*, *Tetrahedron*, **54**, 13467-13474

Morimoto, T., Nagatsu, A., Murakami, N., Sakakibara, J., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A. (1995): Anti-Tumor-Promoting Glycoglycerolipids from the Green Alga *Chlorella vulgaris*, *Phytochem.*, **40**, 1433-1437

Multzsch, R. (1995): Untersuchungen zur Enzymatischen Synthese und zum Grenzflächenverhalten ungewöhnlicher Decansäureoctylester, Dissertation an der TU Braunschweig

Murakami, N., Morimoto, T., Imamura, H., Ueda, T., Nagai, S., Sakakibara, J., Yamada, N., (1991): Studies on Glycolipids: III. Glycoglycerolipids from an Axenically Cultured Cyanobacterium *Phormidium tenue*, *Chem. Pharm. Bull.*, **39**, 2277-2281

Murakami, A., Nakamara, Y., Koshimizu, K., Ohigashi, H. (1995): Glycoglycerolipids from *Citrus hystrix*, a Traditional Herb in Thailand, Potently Inhibit the Tumor-Promoting Activity of 12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetate, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 2779-2783

Nävecke, R., Tepper, K. P. (1986): Einführung in die mikrobiologischen Arbeitsmethoden, G. Fischer Verlag, Stuttgart

Nelis, H. J., Leenheer, A. P. (1989): Reinvestigation of *Brevibacterium* sp. Strain KY-4313 as a Source of Canthaxanthin, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 2505-2510

Niepel, T., Meyer, H., Wray, V., Abraham, W. R. (1997): A New Type of Glycolipid, 1-[α - Mannopyranosyl - (1 α -3) - (6-O-acyl- α -mannopyranosyl)] - 3 - O - acylglycerol, from *Arthrobacter atrocyaneus*, *Tetrahedr.*, **53**, 3593-3602

Nishiyama, T., Nakamatsu, T., Maeda, O. (1993): Adenosine Production by an Adenine Revertant Derived from an Inosine Producer, *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **67**, 843-847

Nissen, E., Vollenbroich, D., Pauli, G. (1997): Application of Surfactin for Mycoplasma Inactivation in Virus Stocks, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **33**, 414-415

Normenausschuss Medizin (1989): Methoden zur Empfindlichkeitsprüfung von bakteriellen Krankheitserregern (außer Mykobakterien) gegen Chemotherapeutika. Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration nach der Bouillon-Dilutionsmethode (Makrodilution), DIN 58940 Teil 5

Nuhn, P. (1997): Naturstoffchemie, 3. Auflage, S. Hirzel Verlag, Stuttgart

Ohno, A., Ano, T., Shoda, M. (1995): Effect of Temperature on Production of Lipopeptide Antibiotics, Iturin A and Surfactin by a Dual Producer, *Bacillus subtilis* RB14, in Solid-State Fermentation, *J. Fermentation and Bioengineering*, **80**, 517-519

Ogawa, A., Murate, T., Izuta, S., Takemura, M., Furuta, K., Kobayashi, J., Kamikawa, T., Nimura, Y., Yoshida, S. (1998): Sulfated Glycoglycerolipid from Archaeobacterium

Inhibits Eukaryotic DNA-Polymerase α , β and Retroviral Reverse Transcriptase and Affects Methyl Methanesulfonate Cytotoxicity, *Int. J. Cancer*, **76**, 512-518

Osinga, R., Tramper, J., Wiffels, R. H. (1998): Cultivation of Marine Sponges for Metabolite Production: Applications for Biotechnology? *Trends Biotechnol.*, **16**, 130-134

Passeri, A., Schmidt, M., Haffner, T., Wray, V., Lang, S., Wagner, F. (1992): Marine Biosurfactants, IV. Production, Characterization and Biosynthesis of an Anionic Glucose Lipid from the Marine Bacterial Strain MM1, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 281-286

Pettit, G.R., Herald, C. L., Doubek, D. L., Herald, D. L., Arnold, E., Clardy, J. (1982): Isolation and Structure of Bryostatin 1, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 6846-6848

Proksch, P., Schupp, P. (1996): Chemische Ökologie mariner Invertebraten, *BIOforum*, **1-2**, 22-26

Riedel, R. (1983): Fauna und Flora des Mittelmeeres, 3. Auflage, Paul Parey, Hamburg

Rinehart, K. L., (1990): Bioactive Compounds from Aquatic and Terrestrial Sources, *J. Nat. Prod.*, **53**, 771

Roussis, R., Zhongde, W., Fenical, W. (1990): New Antiinflammatory Pseudopterosins from the Marine Octocoral *Pseudopterogorgia elisabethae*, *J. Org. Chem.*, **55**, 4916-4922

Saito, K., Mukoyama, K. (1971): Diglucosyl Diglyceride from *Bacillus cereus*, *J. Biochem.*, **69**, 83

Schneider, J., Taraz, K., Budzikiewicz, H., Deleu, M., Thonart, P., Jacques, P. (1999): The Structure of Two Fengycins from *Bacillus subtilis* S499, *Z. Naturforsch.*, **54c**, 859-866

Shekan, P., Storeng, R., Scudiero, D. (1990): New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer Drug Screening, *J. Nat. Cancer Inst.*, **82**, 1107-1112

Shiozawa, H., Shimada, A., Takahashi, S. (1997): Thimarins D, E, F and G, New Hybrid Antimicrobial Antibiotics Produced by a Marine Bacterium; Isolation, Structure and Antimicrobial Activity, *J. Antibiot.*, **50**, 449-452

Shirahashi, H., Murakami, N., Watanabe, M., Nagatsu, A., Sakakibara, J., Tokuda, H., Nishino, H., Iwashima, A. (1993): Isolation and Identification of Anti-Tumor-Promoting Principles from the Fresh-Water Cyanobacterium *Phormidium tenue*, *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1664-1666

Sigel, M. M., Wellham, L. L., Lichter, W., Dudeck, L. E., Gargus, J., Lucas, A.H. (1969): Anticellular and Antitumor Activity of Extracts from Tropical Marine Invertebrates, *Food-Drugs from the Sea Proceedings*, 281-294

Sinclair, J. B. (1989): *Bacillus subtilis* as a biocontrol agent for plant diseases, *Perspectives in plant pathology*, Today und Tomorrow's Printers and Publishers, New Dehli, 367-374

Sneath, P. H. A., Nicholas, S. M., Sharpe, M. E., Holt, G. J. (1986): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore, 1130

Sokoll, A. (1999): Untersuchung der Initiation der Surfactin-Biosynthese in *Bacillus subtilis* OKB 105, Dissertation an der TU Berlin

Sommer, U. (1998): *Biologische Meereskunde*, 1. Auflage, Springer-Verlag, Berlin

Stache, H. (1981): *Tensidtaschenbuch*, 2. Auflage, Carl Hanser Verlag, München

Stahl, E., Kaltenbach, U. (1961): Pseudomonic Acid Derivaties from a Marine Bacterium, *J. Chromatog.*, **5**, 351

Staley, J.T., Gosink, J. J. (1999): Poles Apart: Biodiversity and Biogeography of Sea Ice Bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**, 189-215

Stierle, A. C., Cardellina, J. H., Singleton, F. L. (1988): A Marine Micrococcus Produces Metabolites Ascribed to the Sponge *Tedania ignis*, *Experientia*, **44**, 1021

Stransky, H., Hager, A. (1970): Das Carotinoidmuster und die Verbreitung des lichtinduzierten Xanthophyllcyclus in verschiedenen Algenklassen, *Arch. Mikrobiol.*, **71**, 164-190

Takaichi, S., Shimada, K., Ishidsu, J. (1988): Monocyclic Crossconjugated Carotenal from an Aerobic Photosynthetic Bacterium, *Erythrobacter longus*, *Phytochemistry*, **27**, 3605-3609

Takaichi, S., Shimada, K., Ishidsu, J. (1990): Carotenoids from the Aerobic Photosynthetic Bacterium, *Erythrobacter longus*, β -Carotene and its Hydroxyl Derivatives, *Arch Microbiol.*, **153**, 118-122

Takaichi, S., Furihata, K., Ishidsu, J., Shimada, K. (1991): Carotenoid Sulphates from the Aerobic Photosynthetic Bacterium, *Erythrobacter longus*, *Phytochemistry*, **30**, 3411-3415

Thimann, K. V. (1964): Das Leben der Bakterien, Gustav Fischer Verlag, Jena

Thomas, D. W., Ito, T. (1969): The Revised Structure of the Peptide Antibiotic Esperin, Established by Mass Spectrometry, *Tetrahedron Lett.*, **25**, 1985-1990

Vollbrecht, E., Heckmann, R., Wray, V., Nimtz, M., Lang, S. (1998): Production and Structure Elucidation of Di- and Oligosaccharid Lipids (Biosurfactants) from *Tsukamurella* spec. nov., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **50**, 530-537

Vollbrecht, E. (1999): Mikrobielle Produktion von Oligosaccharidlipiden auf der Basis pflanzlicher Öle durch *Tsukamurella* spec. nov., Dissertation an der TU Braunschweig

Vollenbroich, D. (1996): Biosynthese und biotechnologische Anwendungen des Lipopeptids Surfactin aus *Bacillus subtilis*, Dissertation an der TU Berlin

Walker, J. E., Abraham, E. P. (1970): The Structure of Bacilysin and Other Products of *Bacillus subtilis*, *Biochem. J.*, **118**, 563-570

Wandke, H. (1992): Der Einfluß von bakteriellen Antagonisten auf das Wachstum und den Befall von Tomatenpflanzen durch *Phytophthora nicotianae* v. *Breda de Haan* var. *nicotianae* in NFT, Diplomarbeit an der Humboldt-Universität Berlin

Ward, O. P., Fang, J., Li, Z. (1997): Lipase-catalysed Synthesis of a Sugar Ester Containing Arachidonic Acid, *Enzyme Microb. Technol.*, **20**, 52-56

Wattenberg, L. W. (1993): *Cancer Res.*, **53**, 5890-5896

Wicke, C. (1999): Produktion und Charakterisierung von biologisch und physikochemisch wirksamen Metaboliten aus dem marinen schwamm-assoziierten *Microbacterium* spec. nov. DSM 12583, Dissertation an der TU Braunschweig

Wicke, C., Hüners, M., Wray, V., Nimtz, M., Bilitewski, U., Lang, S. (2000): Production and Structure Elucidation of Glycoglycerolipids from a Marine Sponge-Associated *Microbacterium* Species, *J. Nat. Prod.*, **63**, 621-625

Wright, A. E., Forleo, D. A., Gunawardana, G. P., Gunasekera, S. P., Koehn, F. E., McConnell, O. J. (1990): Antitumor Tetrahydroisoquinoline Alkaloids from the Colonial Ascidian *Ecteinascidia turbinata*, *J. Org. Chem.*, **55**, 4508-4512

Yosief, T., Rudi, A., Stein, Z., Goldberg, I., Gravalos, G. M. D., Schleyer, M., Kashman, Y. (1998): Asmarines A-C; Three Novel Cytotoxic Metabolites from the Marine Sponge *Raspaila* spec., *Tetrahedr. Lett.*, **39**, 3323-3326

Yurkov, V., Gad'on, N., Drews, G. (1993): The Major Part of Polar Carotenoids of the Aerobic Bacteria *Roseococcus thiosulfatophilus* RB3 and *Erythromicrobium ramosum* E5 is not Bound to the Bacteriochlorophyll a-complexes of the Photosynthetic Apparatus, *Arch Microbiol.*, **160**, 372-376

VII Anhang

1. Tabellen zur Kernspinresonanzspektroskopie und Massenspektrometrie

Tabelle VII.1: ¹HNMR-Daten des Glycoglycerolipide GGL11 in CD₃OD.

| Verbindung | Molekülteil | | δ [ppm] | J [Hz] | |
|--------------|---------------------|-----------------------|---------|------------------------|------|
| GGL11 | Glucose'' | H-1 | 4.35 d | (1-2) | 7.8 |
| | | H-2 | 3.30 d | (2-3) | 8.6 |
| | | H-3 | 3.42 m | | |
| | | H-4 | 3.42 m | | |
| | | H-5 | 3.32 m | | |
| | | H-6A | 3.87 dd | (6A-5) | 2.5 |
| | | H-6B | 3.73 m | (6B-5) | 5.5 |
| | | | | (6A-6B) | 12.0 |
| | Glucose' | H-1 | 4.28 d | (1-2) | 7.8 |
| | | H-2 | 3.26 dd | (2-3) | 9.2 |
| | | H-3 | 3.47 t | (3-4) | 9.2 |
| | | H-4 | 3.38 t | (4-5) | 9.0 |
| | | H-5 | 3.46 m | | |
| | | H-6A | 4.15 dd | (6A-5) | 2.0 |
| | | H-6B | 3.82 dd | (6B-5) | 4.7 |
| | | | | (6A-6B) | 11.3 |
| | Glycerin | H-1A | 4.40 dd | (1A-2) | 3.0 |
| | | H-1B | 4.23 dd | (1B-2) | 6.7 |
| | | | | (1A-1B) | 12.1 |
| | | H-2 | 5.27 m | | |
| | | H-3A | 3.97 dd | (3A-2) | 5.5 |
| | | H-3B | 3.74 m | (3B-2) | 5.5 |
| | | | | (3A-3B) | 11.0 |
| | Anteiso-Form | H-ω | 0.86 t | (ω-(ω-1)) | 6.8 |
| | | H-(ω-1)A | 1.26 m | | |
| | | H-(ω-1)B | 1.12 m | | |
| | | H-(ω-2) | 2.35 m | | |
| | | H-(ω-3) | 1.26 m | | |
| | | (ω-2)-CH ₃ | 0.88 d | CH ₃ -(ω-2) | 6.5 |
| | | | | | |
| | Iso-Form | H-ω | 0.86 d | (ω-(ω-1)) | 6.8 |
| | | H-(ω-1)A | 1.52 m | | |
| | | H-(ω-2) | 1.16 m | | |

d: Dublett, t: Triplett, m: Multiplett.

Tabelle VII.2: ^1H NMR-Daten des Glycoglycerolipids GGL12 in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (7:3).

| Verbindung | Molekülteil | | δ [ppm] | J [Hz] | |
|--------------|----------------------|------|----------------|-----------------|------|
| GGL12 | Glucose'' | H-1 | 4.34 d | (1-2) | 7.7 |
| | | H-2 | 3.30 t | (2-3) | 9.0 |
| | | H-3 | 3.44 m | (3-4) | 9.4 |
| | | H-4 | 3.37 m | (4-5) | 9.4 |
| | | H-5 | 3.48 m | | |
| | | H-6A | 4.43 dd | (6A-5) | 2.1 |
| | | H-6B | 4.25 dd | (6B-5) | 6.1 |
| | | | | (6A-6B) | 11.9 |
| | Glucose' | H-1 | 4.29 d | (1-2) | 7.7 |
| | | H-2 | 3.30 dd | (2-3) | 9.0 |
| | | H-3 | 3.44 m | (3-4) | 9.1 |
| | | H-4 | 3.37 m | (4-5) | 9.0 |
| | | H-5 | 3.51 m | | |
| | | H-6A | 4.21dd | (6A-5) | 2.2 |
| | | H-6B | 3.72 dd | (6B-5) | 6.4 |
| | | | | (6A-6B) | 11.1 |
| | Glycerin | H-1A | 4.14 m | (1A-2) | 5.9 |
| | | H-1B | 4.14 m | (1B-2) | 4.7 |
| | | | | (1A-1B) | 11.4 |
| | | H-2 | 4.00 m | | |
| | | H-3A | 3.82 m | (3A-2) | 3.8 |
| | | H-3B | 3.82 m | (3B-2) | 9.8 |
| | 4-Pentensäure | H-2A | 2.47 m | | |
| | | H-2B | 2.47 m | | |
| | | H-3A | 2.39 m | (3A-4) | 6.4 |
| | | H-3B | 2.39 m | (3B-4) | 6.4 |
| | | H4 | 5.83 ddt | (4-5 cis) | 10.3 |
| | | H-5A | 5.07 ddt | (4-5 trans) | 17.1 |
| | | H-5B | 5.01 dm | (5 cis-5 trans) | 1.5 |

d: Dublett, t: Triplett, m: Multiplett.

Tabelle VII.3: ¹HNMR-Daten des Glycoglycerins GG11 in CD₃OD.

| Verbindung | Molekülteil | | δ [ppm] | J [Hz] | |
|-------------|------------------|------|---------|---------|------|
| GG11 | Glucose'' | H-1 | 4.46 d | (1-2) | 7.8 |
| | | H-2 | 3.32 m | (2-3) | 8.6 |
| | | H-3 | 3.50 m | | |
| | | H-4 | 3.82 m | | |
| | | H-5 | 3.42 m | | |
| | | H-6A | 3.92 m | (6A-5) | 2.3 |
| | | H-6B | 3.74 dd | (6B-5) | 5.1 |
| | | | | (6A-6B) | 12.0 |
| | Glucose' | H-1 | 4.50 d | (1-2) | 7.8 |
| | | H-2 | 3.32 m | (2-3) | 9.0 |
| | | H-3 | 3.50 m | (3-4) | 9.2 |
| | | H-4 | 3.82 m | (4-5) | 9.0 |
| | | H-5 | 3.62 m | | |
| | | H-6A | 4.22 dd | (6A-5) | 1.5 |
| | | H-6B | 3.87 dd | (6B-5) | 5.7 |
| | | | | (6A-6B) | 11.5 |
| | Glycerin | H-1A | 3.38 m | (1A-2) | 3.5 |
| | | H-1B | 3.38 m | (1B-2) | 6.7 |
| | | | | (1A-1B) | 12.4 |
| | | H-2 | 3.38 m | | |
| | | H-3A | 3.92 m | (3A-2) | 5.4 |
| | | H-3B | 3.92 m | (3B-2) | 5.3 |
| | | | | (3A-3B) | 11.0 |

d: Dublett, t: Triplett, m: Multiplett.

Tabelle VII.4: ^{13}C -NMR-Daten des Glycoglycerolipids GGL11 in CD_3OD .

| Verbindung | Molekülteil | δ [ppm] |
|--------------|---------------------|-------------------------------|
| GGL11 | Glucose'' | C-1 |
| | | 103.8 |
| | | C-2 |
| | | 74.0 |
| | | C-3 |
| | | 76.9 |
| | Glucose' | C-4 |
| | | 70.6 |
| | | C-5 |
| | | 76.9 |
| | | C-6 |
| | | 62.1 |
| | Glycerin | C-1 |
| | | 104.1 |
| | | C-2 |
| | | 74.0 |
| | | C-3 |
| | | 76.9 |
| | Anteiso-Form | C-4 |
| | | 70.2 |
| | | C-5 |
| | | 75.8 |
| | | C-6 |
| | | 69.2 |
| | Iso-Form | C-1 |
| | | 63.2 |
| | | C-2 |
| | | 68.6 |
| | | C-3 |
| | | 69.4 |
| | Anteiso-Form | C- ω |
| | | 11.5 |
| | | C-(ω -1) |
| | | 29.9 |
| | | C-(ω -1)' |
| | | 34.7 |
| | Iso-Form | C-(ω -2) |
| | | 37.0 |
| | | C-(ω -3) |
| | | 25.2 |
| | | (ω -2)- CH_3 |
| | | 19.4 |
| | Iso-Form | C- ω |
| | | 22.8 |
| | | C-(ω -1) |
| | | 28.3 |
| | | C-(ω -1)' |
| | | 39.4 |

Tabelle VII.5: ^{13}C -NMR-Daten des Glycoglycerolipids GGL12 in $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (7:3).

| Verbindung | Molekülteil | δ [ppm] | |
|--------------|----------------------|----------------|-------|
| GGL12 | Glucose'' | C-1 | 104.0 |
| | | C-2 | 76.8 |
| | | C-3 | 74.5 |
| | | C-4 | 70.7 |
| | | C-5 | 74.1 |
| | | C-6 | 64.1 |
| | Glucose' | C-1 | 104.3 |
| | | C-2 | 76.9 |
| | | C-3 | 75.9 |
| | | C-4 | 70.7 |
| | | C-5 | 74.1 |
| | | C-6 | 69.5 |
| | Glycerin | C-1 | 65.7 |
| | | C-2 | 69.1 |
| | | C-3 | 72.8 |
| | 4-Pentensäure | C-1 | 174.2 |
| | | C-2 | 33.8 |
| | | C-3 | 29.2 |
| | | C-4 | 137.0 |
| | | C-5 | 115.9 |

Tabelle VII.6: ^{13}C -NMR-Daten des Glycoglycerins GG11 in CD_3OD .

| Verbindung | Molekülteil | δ [ppm] | |
|-------------|------------------|----------------|-------|
| GG11 | Glucose'' | C-1 | 103.9 |
| | | C-2 | 74.3 |
| | | C-3 | 77.0 |
| | | C-4 | 70.6 |
| | | C-5 | 76.8 |
| | | C-6 | 61.9 |
| | Glucose' | C-1 | 104.0 |
| | | C-2 | 74.3 |
| | | C-3 | 77.2 |
| | | C-4 | 70.8 |
| | | C-5 | 76.1 |
| | | C-6 | 69.5 |
| | Glycerin | C-1 | 63.4 |
| | | C-2 | 71.6 |
| | | C-3 | 72.1 |

Tabelle VII.7: Massenspektrometrische Daten der Lipidzusammensetzung mittels ESI MS.

| Verbindung [g/mol] | Positiv-Ion $[\text{M} + \text{Na}]^+$ [g/mol] | Fettsäure [%] | Anteil der Fettsäure [%] |
|-----------------------|---------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| GGL11 864 | 859 | ai-C 14 | 5 |
| | 873 | ai-C 14 (50) ai-C 15 (50) | 10 |
| | 887 | ai-C 15 | 25 |
| | 901 | ai-C 15 (50) i-C 16 (50) | 15 |
| | 915 | ai-C 15 (50) ai-C 17 (50) | 40 |
| GGL12 580 | 603 | 4-Pentensäure | 100 |
| GG11 416 | 439 | - | - |

2. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--------------------------------------------------------|
| Abb. | Abbildung |
| ai | anteiso |
| BTM | Biotrockenmasse |
| CMC | kritische Micellbildungskonzentration |
| d | Tage; Dublett (NMR-Spektroskopie) |
| δ | chemische Verschiebung |
| DC | Dünnschichtchromatographie |
| dest. | destilliert |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DSMZ | Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen |
| EBV-EA | Epstein-Barr-Virus - Early-Antigen |
| ED ₅₀ | Effektive Dosis |
| EMA | Emulgatoraktivität |
| GC | Gaschromatographie |
| G | Glucose |
| γ | Grenzflächenspannung |
| GGL | Glycoglycerolipid |
| GI ₅₀ | Growth Inhibition |
| GL | Glycolipid |
| h | Stunden |
| HE | Hefeextrakt |
| HLB | Hydrophilic Lipophilic Balance |
| Hz | Hertz |
| i | iso |
| J | Kopplungskonstante (NMR-Spektroskopie) |
| IC ₅₀ | Inhibition Concentration |
| L | Liter |
| Lsg. | Lösung |
| m | Multiplett (NMR-Spektroskopie) |
| MB | Marine Broth |
| MeOH | Methanol |
| MHK | Minimale Hemmkonzentration |
| min | Minuten |

| | |
|---------------|---------------------------------------------|
| MS | Massenspektrometrie |
| MTBE | tert-Butylmethylether |
| mM | Millimol |
| $\mu_{(max)}$ | (maximale) spezifische Wachstumsrate |
| NB | Nutrient Broth |
| NMR | Kernresonanzspektroskopie |
| nov. | Novum |
| NP | normal phase |
| OD | Optische Dichte |
| Ö/W | Öl in Wasser-Emulsion |
| pO_2 | Sauerstoffpartialdruck |
| ppm | parts per million |
| P_V | Volumetrische Produktivität |
| Q_{CO_2} | Kohlendioxidbildungsrate |
| Q_{O_2} | Sauerstoffaufnahmerate |
| R_f | Verhältnis Laufhöhe zu Laufmittelfront (DC) |
| RQ | Respiratorischer Quotient |
| RT | Raumtemperatur |
| R4 | Rhamnoselipid |
| σ | Oberflächenspannung |
| SM1 | Synthetisches Meerwassermedium 1 |
| spec. | Spezies |
| T | Temperatur |
| t | Triplett (NMR-Spektroskopie) |
| Tab. | Tabelle |
| TGI | Total Growth Inhibition |
| TPA | 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat |
| UPM | Umdrehungen pro Minute |
| v/vm | Volumen pro Volumen und Minute |
| v/v/v | Volumen / Volumen / Volumen |
| W/Ö | Wasser in Öl-Emulsion |
| $Y_{P/S}$ | Spezifischer Ausbeutekoeffizient |
| $Y_{P/X}$ | Produktertragskoeffizient |
| $Y_{X/S}$ | Ertragskoeffizient |